

Paris 1964

SERAFINO ZAPPACOSTA

Docteur en Médecine de l'Université de Naples

Docteur de l'Université de Paris [Sciences]

BIOGENESE DE L'HYPOTAUROCYAMINE ET DE LA TAUROCYAMINE



SERAFINO ZAPPACOSTA

Docteur en Médecine de l'Université de Naples

Docteur de l'Université de Paris (Sciences)

BIOGENESE DE L'HYPOTAUROCYAMINE ET DE LA TAUROCYAMINE





BIOGENESE DE L' HYPOTAUROCYAMINE ET DE LA TAUROCYAMINE

Travail réalisé au Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée
du Collège de France à Paris et au Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France
à Concarneau, Finistère, sous la direction de Monsieur NGUYEN VAN THOAI,
Directeur de Recherches au C. N. R. S.

A ma femme

A mes parents

A mon fils

A mon Maître

Monsieur le Professeur LUIGI CALIFANO

A Monsieur le Recteur JEAN ROCHE

A Monsieur NGUYEN VAN THOAI

A Madame YVONNE ROBIN

A mon Jury de Thèse

Monsieur le Professeur E. LEDERER

Monsieur le Professeur R. ACHER

Monsieur le Professeur H. CLAUSER

A mes amis et collègues
du Laboratoire de Pathologie Générale
de l'Université de Naples

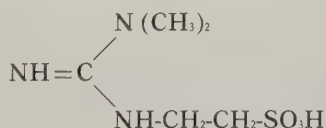
Introduction

LES GUANIDINES SOUFREES BIOLOGIQUES

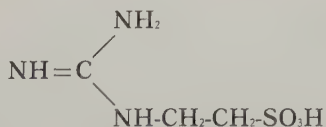
Les dérivés guanidiques soufrés actuellement connus, tous appartenant au groupe des acides α -guanidiques (100), comprennent l'astérubine, la taurocyamine, l'hypotaurocyamine et les dérivés phosphorylés (phosphagènes) des deux derniers, la N-phosphocryltaurocyamine ou plus brièvement phosphotaurocyamine et la phosphohypotaurocyamine.

I. STRUCTURE CHIMIQUE

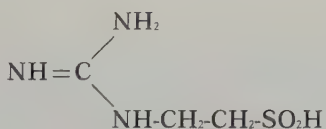
1. *Astérubine* (acide N' diméthyl-2-guanidoéthanesulfonique)



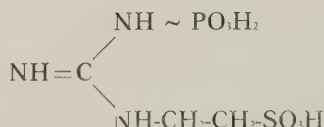
2. *Taurocyamine* ou *Amidinotaurine* (acide 2-guanidoéthanesulfonique)



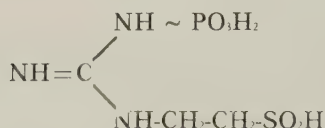
3. *Hypotaurocyamine* ou *Amidinohypotaurine* (acide 2-guanidoéthanesulfonique)



4. *Phosphotaurocyamine* (acide N' phosphoryl. 2.guanidoéthanesulfonique)



5. *Phosphchypotaurocyamine* (acide N' phosphoryl. 2.guanidoéthanesulfonique)



Tous ces corps dérivent chimiquement de la taurine (acide 2.aminoéthanesulfonique) ou de son analogue sulfonique, l'hypotaurine.

C'est en raison de la présence du groupement guanidique dans leur molécule que certains de ces dérivés peuvent donner naissance aux phosphagènes correspondants: cette propriété — qui, comme nous verrons, se rattache à leur rôle physiologique essentiel — est fondée sur la basicité particulière du groupement guanidique, laquelle facilite la combinaison de ce dernier avec le reste phosphorique. La structure chimique des phosphagènes permet d'expliquer leur labilité particulière en milieu acide, caractère commun aux dérivés de cette catégorie, ainsi que leur énergie libre d'hydrolyse élevée. Ces caractères sont dus, selon KALCKAR (52), à une opposition de résonance entre les groupements phosphoryle et guanidyle, à travers l'azote amidinique, chaque système résonant pour son propre compte, avec pour résultat une diminution de la capacité de résonance et de la stabilité chimique de l'ensemble.

II. REPARTITION

Du point de vue biologique, le plus anciennement connu de ces dérivés est l'astérubine, isolée et identifiée en 1935 par ACKERMANN (2) chez des étoiles de mer, *Asterias rubens* et *A. glacialis*. Jusqu'à présent elle n'a pas été signalée dans d'autres groupes zoologiques, par suite de la difficulté de sa mise en évidence; à cause de la triple substitution du groupement guanidique, ce corps ne réagit pas avec les réactifs généraux des dérivés guanidiques.

La taurocyamine, préparée par ENGEL (42) depuis 1875 et par DITTRICH (36), étudiée en 1935 du point de vue pharmacologique par ACKERMANN et HEINSEN (4), n'a été identifiée qu'en 1953 chez des organismes vivants par

THOAI et coll. (92). Isolée pour la première fois par THOAI et ROBIN en 1954 (94) dans le muscle d'une Annélide marine, *Arenicola marina* L., elle semble plus largement répartie que l'astérubine. On la trouve non seulement chez des Invertébrés, mais aussi chez des Vertébrés: chez les premiers, elle existe en forte proportion dans le muscle de plusieurs Annélides Polychètes Sédentaires (92,93,69,5,77) et, en faibles quantités, chez quelques Coelentérés et Spongiaires (70), tandis que, chez les seconds, de petites quantités ont été décelées dans l'urine humaine et de rat (96,97,75,84) et dans le cerveau des Mammifères (13).

Elle est parfois accompagnée du dérivé phosphorylé correspondant, la phosphotaurocyamine, qui joue alors le rôle de phosphagène musculaire. Tel est le cas chez divers Annélides Polychètes Sédentaires (92,93,51), où la phosphotaurocyamine, identifiée en 1953 par THOAI et coll. (92), a été retrouvée par divers chercheurs (5,51).

L'hypotaurocyamine et la phosphohypotaurocyamine viennent d'être isolées et caractérisées par ROBIN et THOAI (72) dans les tissus de deux Géphyriens, *Phascolosoma vulgare* Blainville et *P. elongatum* Kfst., à côté de traces de taurocyamine. L'hypotaurocyamine (72) ainsi que son dérivé phosphorylé (78) ont été récemment signalés aussi chez l'Arénicole, dont les constituants guanidiques principaux sont la taurocyamine et la phosphotaurocyamine.

III. METHODES DE PREPARATION

La méthode générale de préparation des dérivés guanidiques soufrés consiste à amidiner les dérivés aminés correspondants, par exemple la taurine ou l'hypotaurine, au moyen d'une gamme assez large de réactifs: la cyanamide (89, 106, 44, 42, 36, 90, 85, 43, 104, 105, 4), la S-méthyl ou la S-éthylisothiourée (82, 86, 18, 60, 56), la O-méthylisourée (53, 86, 88, 9) ou le bromure de cyanogène (38,46). Au laboratoire on emploie couramment le sulfate de S-méthylisothiourée en milieu alcalin, à la température ordinaire (86).

L'astérubine est obtenue en faisant réagir la taurine avec la diméthylcyanamide (3) ou mieux encore la cyanamide diméthylée avec la cystamine et en oxydant ensuite le groupement disulfure (83).

Quant aux phosphagènes, la méthode générale de préparation est basée sur la phosphorylation des bases guanidiques correspondantes, par l'oxychlorure de phosphore en milieu alcalin (113). Les phosphagènes sont séparés sous forme de sels alcalino-terreux et, après traitement aux échangeurs d'ions, cristallisés (94 à 99% de pureté) (65) sous forme de sels alcalins. La phosphotaurocyamine est obtenue en général sous forme de sel d'ammonium (99), tandis que la phosphohypotaurocyamine n'a été obtenue jusqu'à présent que par voie biosynthétique.

IV. METABOLISME

L'un des aspects les plus intéressants de la biochimie des dérivés guanidiques soufrés réside d'une part dans les multiples relations métaboliques que ces corps semblent établir entre la dégradation de l'arginine et celle de la cystéine et, d'autre part, dans la réutilisation de métabolites de ces acides aminés pour la formation de donateurs d'énergie aussi importants que les phosphagènes.

1. *Rôle dans le métabolisme du phosphore.* Ce rôle, intéressant surtout la taurocyamine et l'hypotaurocyamine, réside essentiellement dans le transport de phosphate au cours de la contraction musculaire. L'acide adénosinetriphosphorique (ATP), dégradé durant le travail musculaire, se reconstitue partiellement grâce à la réaction réversible:



où le phosphagènes ($G \sim P$) jouent le rôle de donateurs de phosphates. Cette réaction de transfert est catalysée par les guanidophosphoryltransférases (ATP:guanidophosphoryltransférases) spécifiques des différents phosphagènes et dont la répartition dans divers groupes zoologiques est parallèle à celle de ces derniers.

L'isolement des phosphagènes, leur caractérisation et l'étude de leur répartition — créatinephosphate chez les Vertébrés (45), argininephosphate chez les Invertébrés en général (59) à côté de taurocyaminephosphate chez les Annélides Polychètes Sédentaires (92), de glycocyaminephosphate chez des Annélides Polychètes Errantes (92), de lombricinephosphate chez les Oligochètes (95) et finalement d'hypotaurocyaminephosphate chez des Géphyriens (72) — ont conduit naturellement à l'étude des enzymes transphosphorylants correspondants. C'est ainsi que la découverte de la phosphotaurocyamine a conduit à la mise en évidence chez l'Arénicole, en 1957, par THOAI (98), de la taurocyaminephosphokinase, qui a été purifiée et étudiée en détail récemment par THOAI et PRADEL (64,65). L'enzyme qui catalyse la réaction réversible:



se recontre non seulement chez *Arenicola marina*, mais chez tous les animaux dont le phosphagène est constitué par de la phosphotaurocyamine (92,93,51).

De la même façon la découverte toute récente de la phosphohypotaurocyamine dans les phascolosomes (72) a conduit à la mise en évidence et à l'étude de la phosphoryltransférase correspondante, catalysant la réaction réversible (101):



et expliquant le rôle de transporteur de phosphate du nouveau phosphagène.

Il faut souligner ici la remarquable spécificité de la taurocyaminephosphokinase et de l'hypotaurocyaminephosphokinase, dont les substrats respectifs ne diffèrent que par la présence du groupe sulfonique ou sulfinique.

L'activité de la première vis-à-vis de la taurocyamine est triple de celle exercée à l'égard de l'hypotaurocyamine; inversement, l'hypotaurocyaminephosphokinase est trois fois plus active avec le dérivé sulfinique qu'avec le produit sulfonique (101).

2. *Relations avec le métabolisme du soufre.* La place des dérivés guanidiques soufrés dans le cadre du métabolisme du soufre n'est pas connue. Les divers problèmes se rattachant au groupe soufré, soit en ce qui concerne son origine et sa dégradation, soit du point de vue de son rôle biologique, n'ont pas été abordés jusqu'à présent.

La taurocyamine, qui ne participe pas à la formation du phosphagène musculaire chez les Vertébrés, ne semble jouer qu'un rôle infime dans le métabolisme soufré de ces animaux. Sa présence à l'état de traces dans les urines des Mammifères (rats, hommes) (69,97,75,84) exclut tout rôle important de ce corps dans l'excrétion soufrée. Même sa présence dans le cerveau, mais à des taux tellement faibles (13), explique difficilement une participation active de ce corps au métabolisme soufré chez les animaux supérieurs.

Par contre, sa présence en quantités très importantes chez certains invertébrés, particulièrement chez des Polychètes Sédentaires vivant dans les vases marines, constitue la preuve d'une participation importante de ce corps au métabolisme soufré chez ces animaux. L'étude de ce dernier chez les Invertébrés n'avait pas été abordée jusqu'au récent travail d'ABBOTT et AWAPARA sur *Arenicola cristata* Stimpson (1). Ce travail, poursuivi d'une manière systématique, a permis de mettre en évidence chez ces animaux plusieurs dérivés communs aux Vertébrés et d'établir, grâce aux molécules marquées par ^{33}S , les relations métaboliques qui les lient les uns aux autres. Les résultats obtenus montrent que, dans l'ensemble, il n'existe pas dans ce domaine de différences importantes entre les Invertébrés et les Vertébrés. L'acide cystéinesulfinique joue toujours le rôle de métabolite essentiel; produit de dégradation de la méthionine ou de la cystéine, il peut être décarboxylé en hypotauroine (31,10,11) qui, à son tour, est oxydée en taurine. Le rôle métabolique de la cystathionine est le même chez les Invertébrés et les Vertébrés. L'oxydation de la cystine ou de la cystéine en sulfate, la transamination entre le cystéinesulfinat et le cétooglutarate avec formation de glutamate et de β -sulfinylpyruvate (46,54,55,32) sont également retrouvées chez les Invertébrés. Enfin les essais *in vitro* d'ABBOTT et AWAPARA sur l'Aré-

nicole semblent montrer que l'oxydation de l'hypotaurine en taurine n'est pas enzymatique. D'un point de vue quantitatif, l'hypotaurine et la taurine se trouvent chez ces vers en proportions relativement importantes, respectivement égales à 0,48 et 5,28 μ moles par g de tissu frais. Sauf cette dernière donnée, qui autorise à penser que ces corps peuvent servir de précurseurs aux dérivés guanidiques correspondants, aucun fait expérimental n'a été établi concernant la place de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine dans le cadre du métabolisme soufré.

3. *Relations avec le métabolisme azoté.* Nous savons aujourd'hui que d'une façon générale les dérivés guanidiques biologiques se forment par transamidation des amines correspondantes (63,66,67,107,109). La réaction établie *in vivo* par BLOCH et SCHOENHEIMER (14,15) et *in vitro* par BORSOOK et DUBNOFF (16,17) pour la glycoyamine et la créatine a été étendue par la suite à la plupart d'autres guanidines biologiques, grâce à la spécificité très large des enzymes qui en sont responsables, les transamidinases.

Dès la découverte de la première guanidine soufrée, l'astérubine, KUTSCHER et ACKERMANN (57) ont déjà suggéré, en se basant sur la théorie de transamidation de BERGMANN et ZERVAS émise depuis 1927 (12), que ce corps pouvait se former par transamidation à partir de l'arginine; mais aucune preuve expérimentale n'en a été apportée alors. L'idée a été reprise, également sans succès, par Y. ROBIN (69) pour établir le mode de formation de la taurocyamine. La transamidinase rénale purifiée, capable de former en présence d'arginine les dérivés guanidiques à partir de la glycine, de la β -alanine, des acides γ -aminobutyrique et δ -aminovalérianique, est sans action sur la taurine (102). De même, diverses tentatives d'amidation directe de la taurine ou de la carbamyltaurine ont échoué (100, 103).

Toutefois ABBOTT et AWAPARA (1) paraissent avoir récemment obtenu la formation de taurocyamine marquée en présence de préparations lyophilisées d'organismes entiers d'*Arenicola cristata* additionnées d'arginine et de [35 S] taurine à haute activité spécifique. Toutefois, le taux de synthèse extrêmement bas, au cours du seul essai positif parmi de nombreux autres entièrement négatifs, rend très difficile l'interprétation des résultats obtenus par ces auteurs. Celle-ci est d'autant plus incertaine que la récente découverte de l'hypotaurocyamine, associée dans des proportions différentes à la taurocyamine dans les phascolosomes et dans les arénicoles, pose le problème du véritable précurseur de ces dérivés guanidiques.

L'origine encore obscure de ces derniers, jointe à l'absence apparente des réactions de dégradation de la taurocyamine (69), laisse entièrement hypothétiques les relations existant entre les guanidines soufrées et l'arginine et leur place exacte dans le cadre général du métabolisme azoté.

C'est pour répondre en partie à ces questions que nous avons essayé au cours des présentes recherches, 1° de préciser le mode de formation du groupement amidinique de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine; 2° de déterminer la nature du ou des précurseurs soufrés de ces corps. Ces recherches ont été entreprises aussi bien avec des Vertébrés (Rat, *Rattus rattus* alb.) qu'avec des Invertébrés (*Arenicola marina* L. et *Phascolosoma vulgare* Blainville).

PLAN DES RECHERCHES

Dans une première partie nous exposerons les techniques utilisées au cours de cette étude, en mettant en évidence quelques aspects nouveaux des méthodes employées.

Une deuxième partie portera sur l'étude, réalisée à l'aide de composés marqués à ^{35}S , des précurseurs soufrés de la taurocyamine chez des Vertébrés et des Invertébrés.

Une troisième partie, consacrée à des expériences réalisées *in vivo* sur des vers marins avec l' [amidino- ^{14}C] arginine nous permettra d'étudier: 1° l'origine du groupe amidinique de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine; 2° le lieu de synthèse et l'ordre de formation de ces dérivés.

Enfin, dans une quatrième partie, nous rapporterons quelques essais d'isolement et de purification de la transamidinase de *Phascolosome*.

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIERE PARTIE

MATERIEL ET TECHNIQUES D'ETUDE *

I. MATERIEL

1° *Animaux*. Les exemplaires d'arénicoles, *Arenicola marina* L., sont pêchés dans la baie de Concarneau; ceux de phascolosomes, *Phascolosoma vulgare* Blainville, proviennent de Roscoff (Finistère).

Quant aux rats, on emploie des animaux de souche Wistar, du poids de 200 g $\pm$ 20.

2° *Produits chimiques*. La taurocyamine est synthétisée par amidination de la taurine par la S-méthylisothiourée en milieu alcalin, d'après la méthode de SCHÜTTE (86) modifiée par THOAI et ROBIN (94).

L'hypotaurocyamine est isolée des extraits de phascolosome, purifiée par les échangeurs d'ions et cristallisée plusieurs fois, selon la méthode décrite par ROBIN et THOAI (72).

L'hypotaaurine est également isolée des phascolosomes (72) dont les tissus sont très riches, et son identité contrôlée par rapport à des échantillons du produit synthétisé par la méthode de BRICAS et coll. (19).

La taurine et les autres acides aminés employés sont d'origine commerciale.

Quant aux molécules marquées, la DL- $[^{35}\text{S}]$ cystine, le $[^{35}\text{S}]$ SO_3Na_2 et la DL- $[\text{amidino}-^{14}\text{C}]$ arginine proviennent du C. E. A., le $[^{35}\text{S}]$ SO_3Na_2 du Radiochemical Centre, Amersham, Grande-Bretagne. Nous avons parfois préparé le sulfite de sodium- ^{35}S par réduction de $[^{35}\text{S}]$ SO_3H_2 , selon la méthode de CHAPEVILLE et FROMAGEOT (25).

* Abréviations: ty = taurocyamine; hpty = hypotaurocyamine; ta = taurine; hpta = hypotaaurine; arg = arginine.

II. TECHNIQUES

1° *Essais in vivo*. En général nos recherches sont réalisées à l'aide de l'analyse radiochromatographique sur papier d'extraits aqueux (cas des vers marins: différents tissus) ou d'urine (cas des rats), préalablement traités aux résines échangeuses d'ions, les animaux ayant reçu des molécules marquées à ^{35}S ou à ^{14}C . Les techniques que nous avons couramment utilisées concernent: a. l'emploi de résines échangeuses d'ions; b. la chromatographie sur papier; c. les mesures de radioactivité.

a. Emploi de résines échangeuses d'ions. En conséquence des propriétés électrochimiques des corps dont nous nous proposons la séparation, nous avons trouvé que le passage des extraits aqueux des divers tissus ou de l'urine sur une résine cationique du type polystyrène sulfoné (dans notre cas la permutite 50, 16-50 mesh) sous forme H^+ permet la séparation des corps de pK acide de ceux de pK alcalin. Les premiers (taurine, taurocyamine) ne sont pas fixés, les seconds (arginine, hypotaurocyamine notamment) sont, au contraire, facilement retenus. Ces derniers dérivés sont élués de la permutite par l'ammoniaque et l'éluat (renfermant l'hypotaurocyamine et l'arginine dans le cas des vers) est débarrassé de l'arginine par passage sur une deuxième résine du type carboxylique (amberlite IRC 50, 200-400 mesh) sous forme H^+ , capable de retenir cet acide aminé, mais non l'hypotaurocyamine.

On obtient ainsi deux fractions; une fraction aqueuse renfermant, entre autres produits, la taurocyamine et une fraction ammoniacale renfermant l'hypotaurocyamine.

b. Chromatographie sur papier. - Elle est employée dans des buts préparatifs aussi bien qu'analytiques. Dans le cas de chromatogrammes préparatifs suivis d'élution, le papier (Whatman n° 1) est préalablement lavé à l'acide acétique 2 M. Les solvants les plus fréquemment utilisés sont: pyridine-isoamylol-acide acétique-eau (80:40:10:40) et le phénol saturé d'eau. Température: + 20°.

Les chromatogrammes analytiques sont réalisés systématiquement de façon à obtenir une bande pour la mesure de la radioactivité, à côté de trois bandes pour trois révélations différentes: à l' α -naphtol-hypobromite de sodium (réaction de Sakaguchi, appliquée à la chromatographie par ROCHE et coll. (76), caractéristique des guanidines monosubstituées; à la ninhydrine (ninhydrine à 0,25% dans *n*-butanol saturé d'eau, additionné de 1% d'acide acétique), caractéristique des groupes aminés primaires; à la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (*p*-diméthylaminobenzaldéhyde à 5% dans ClH N), réactif de BARRENSCHEEN et WELTMANN (7), caractéristique des dérivés carbamylés (97). L'ensemble permet une analyse assez complète des extraits étudiés.

c. Mesures de la radioactivité. - Cas de ^{35}S . Les comptages des échantillons liquides sont effectués dans des coupelles d'aluminium à l'aide d'un compteur Tracerlab - modèle SC - 16 G - à gaz sans fenêtre, relié à une échelle C.I.D. Saphymo. Les microgouttes sont étalées à l'aide d'éthanol puis desséchées à l'étuve à $+ 60^\circ$; de cette façon l'épaisseur de la couche peut être considérée comme infiniment mince et, par conséquent, l'autoabsorption comme pratiquement négligeable.

Les chromatogrammes sont comptés centimètre par centimètre avant révélation, soit par un tube de GEIGER-MÜLLER, soit par un compteur à gaz à fenêtre mince relié à la même échelle.

Cas de ^{14}C . Les mesures sont effectuées par comptage des échantillons au spectromètre à scintillation liquide (Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Counting system, modèle 314 EX).

(a) Conditions de lecture: l'un des deux canaux disponibles est suffisant pour nos déterminations, le « quenching » étant corrigé par la méthode du témoin incorporé. (b) Préparation des échantillons: pour le comptage de solutions aqueuses, un mélange homogène de l'eau avec le toluène, employé comme solvant, est obtenu par addition aux échantillons de petites quantités d'éthanol absolu (système ternaire toluène-eau-éthanol) (49, 62, 8, 114). Dans les conditions adoptées, l'éthanol est à 9,1% dans le mélange scintillant (diméthyl-POPOP à 0,5%, PPO à 0,05% dans toluène). (c) Durée des comptages: chaque fiole est comptée pendant un temps suffisant pour obtenir une erreur standard inférieure à 2%. (d) Rendement de comptage: le rendement est calculé, pour chaque série de comptages, à partir du nombre de coups réellement comptés lors de la mesure d'un échantillon ayant la même composition en mélange scintillant-eau-éthanol que les essais, auquel on a ajouté une quantité connue de [^{14}C] toluène, dont l'activité spécifique en désintégrations par minute (d.p.m.) est connue. Le rendement est ainsi exprimé en % de la valeur théorique des d.p.m. de l'étalon: dans le cas de solutions non « quenchées », la valeur du rendement permet d'obtenir facilement l'activité absolue en d.p.m. (e) Détermination des activités absolues en d.p.m.: l'activité absolue des solutions est déterminée lors de la mesure de l'activité spécifique des dérivés guanidiques en question. S'agissant de produits dont la composition n'est pas reproductible, correction est faite du « quenching » par calcul du rendement réel du comptage de chaque échantillon. On applique la méthode du témoin incorporé (« internal standardization ») (50,53) qui consiste en un double comptage de chaque échantillon, le premier effectué sur l'échantillon seul, le deuxième sur l'échantillon auquel on a ajouté une petite quantité d'un corps marqué à ^{14}C , dont l'activité spé-

cifique est connue — dans notre cas, [^{14}C] toluène Packard. — On calcule d'abord le rendement du comptage à l'aide de la formule :

$$R = \frac{\text{c/m.sc. liquide}_{t+e} - \text{c/m.sc. liquide}_e}{\text{d.p.m.}_t}$$

où: c/m/sc. liquide $_{t+e}$ = comptage de l'ensemble échantillon-témoin incorporé, exprimé en coups par minute à scintillation liquide;

c/m/sc. liquide $_e$ = comptage de l'échantillon exprimé en coups par minute à scintillation liquide;

d.p.m. $_t$ = désintégrations par minute du témoin incorporé (valeur connue).

On obtient ensuite l'activité de l'échantillon en d.p.m. par l'expression :

$$\text{d.p.m.}_e = \frac{\text{c/m.sc. liquide}_e - b}{R}$$

où: b = bruit de fond;

R = rendement du comptage.

(f) Comptage de chromatogrammes: les chromatogrammes sont comptés centimètre par centimètre en les découpant en bandes de 1×5 cm; chaque bande est posée dans une fiole et imprégnée du mélange scintillant (3 à 5 gouttes) (61). Chaque série de comptages permet de construire un diagramme sur papier millimétré à partir duquel les activités des différents corps sont mesurées par planimétrie du diagramme et exprimée en % de la radioactivité totale repérée. Après comptage, la bande est reconstituée et révélée suivant la réaction convenable.

2° *Essais in vitro*. Nous avons cherché à purifier la transaminidase des tractus (digestif et génital) du Phascolosome, *Phascolosoma vulgare* Blainville, qui d'après les essais *in vivo* semblent être les tissus les plus actifs à opérer la synthèse de l'hypotaurocyamine, après injection de DL-[ami-dino- ^{14}C] arginine. L'enzyme est purifié selon la méthode de RATNER et ROCHOVANSKI (66) modifiée. Les détails seront exposés lors de la présentation de cette partie de notre étude.

L'activité des fractions obtenues est mesurée par incubation de l'enzyme en présence d'arginine et de l'un des deux acides aminés soufrés prévus comme deuxième substrat (taurine et hypotaurine) et dosage spectrophotométrique des guanidiques synthétisés, après élimination de l'arginine par passage du mélange réactionnel sur résine échangeuse d'ions. Le dosage est effectué sur l'effluent au moyen de la réaction à l' α -naphtol-diacétyle, selon la technique de ROSENBERG et coll. (79) (spectrophotomètre Beckman, modèle B, lectures effectuées à 535 m μ).

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES PRECURSEURS SOUFRES DE LA TAUCYAMINE

I. INTRODUCTION. OBJET DES RECHERCHES

Nous avons abordé cette partie de notre travail d'un double point de vue. En premier lieu, et bien que tous les essais *in vitro* de transamidation de la taurine n'aient donné jusqu'ici aucun résultat (69,100), on pouvait supposer que cette voie métabolique était néanmoins empruntée pour la biosynthèse de la taurocyamine. Le substrat soufré pourrait alors être soit la taurine elle-même qui, dans des conditions favorables — peut être non réalisées *in vitro* — pourrait jouer *in vivo* le rôle d'accepteur du groupement guanidique, soit l'un des dérivés soufrés dont les tissus animaux sont plus ou moins riches et dont on connaît les relations plus ou moins étroites avec la taurine. Dans ce domaine, on sait que l'hypotaurine peut donner naissance à la taurine par oxydation du groupe sulfinique (23,40) et l'acide cystéique par décarboxylation (28). L'hypotaurine elle-même, selon CAVALLINI et coll. (20, 21, 24) et selon AWAPARA (6), provient de la cystine par l'intermédiaire soit de l'acide cystéinesulfinique (31, 10, 11) soit de la cystamine (22, 39). L'acide cystéique dérive de la cystéine par un processus d'oxydation, lequel donne également naissance à l'acide cystéinesulfinique (26).

En second lieu, on connaît l'incorporation du soufre minéral, en général à l'état de sulfite ou de sulfate, dans divers acides aminés et les réactions d'échange des groupes soufrés, en particulier avec l'acide cystéinesulfinique (25, 47), la cystine (37,27), la taurine (58,29) et l'acide cystéique (29) dans les organismes les plus divers: mammifères adultes (25,37,27), l'embryon de veau (47), l'embryon de poulet (58,29). A partir de ces données, on peut supposer une utilisation de soufre inorganique et son incorporation dans quelques dérivés guanidiques précurseurs éventuels de la taurocyamine.

Partant des bases qui viennent d'être discutées, nous avons administré à des rats et à des arénicoles des molécules marquées à ^{35}S , organiques et

inorganiques, et nous avons analysé par radiochromatographie sur papier soit l'urine recueillie (rats) soit les extraits des tissus habituellement riches en amidinotaurine (arénicoles). L'éventualité d'une biosynthèse de la taurocyamine par les microorganismes du tractus intestinal de rat a été également prise en considération: nous avons donc poursuivi des essais comparés en administrant les mêmes produits à des rats dont le contenu intestinal était rendu stérile.

II. PARTIE EXPERIMENTALE

1° *Traitement des animaux.* a) *Rats.* Nos essais ont porté sur 5 lots de rats (animaux adultes, mâles, souche Wistar, poids 200 g $\pm$ 20) traités par des molécules marquées à ^{35}S selon le protocole rapporté au tableau I.

TABLEAU I - Schéma de l'administration de molécules marquées au ^{35}S aux rats

Lot	Nombre d'animaux	Produit administré	Quantité mg	Activité mC	Activité spécifique mC/mM	Temps de collecte des urines
1	3	DL - [^{35}S] cystine	24,9	2,05	19,80	24 heures
2	3	DL - [^{35}S] cystine	24,9	2,05	19,80	24 »
3	2	[^{35}S] sulfite	144,0	0,192	0,126	72 »
4	3	[^{35}S] sulfite	20,05	1,50	9,42	72 »
5	3	[^{35}S] sulfite	23,62	1,66	8,85	72 »

Les animaux des lots 1 et 2 reçoivent par sondage gastrique le produit mis en suspension dans l'eau; ceux des lots 3, 4 et 5 le sulfite en solution isotonique stérile, à pH 7,3 en trois doses administrées à 6 h d'intervalle par injection intrapéritonéale. Le lot 5 est constitué par des rats dont le contenu intestinal est rendu stérile. La stérilisation est obtenue par addition au régime, pendant les 96 heures précédant le traitement, de 150 mg de tetracycline, 10 mg de nystatine et 400 mg de sulfoguanidine par rat et par 24 heures, additionnées d'une association de vitamine lipo- et hydrosolubles, d'après la méthode décrite par SALVATORE (81). Des contrôles de la teneur en bactéries de leur fèces sont opérés, avant le début de l'essai et toutes les 24 heures pendant la récolte des urines, par ensemencement sur gélose de dilutions de suspensions de matières fécales, selon la technique de la double couche de GRATIA (111). Seule l'urine des animaux à intestin pratiquement stérile est soumise à l'analyse. Les urines sont recueillies dans des cages à métabolisme, sous toluène-vaseline, pendant les heures qui suivent l'administration des produits marqués.

b) *Arénicoles*. 5 lots d'arénicoles (*Arenicola marina* L., de taille moyenne) sont traités avec des molécules marquées à ^{35}S selon le protocole rapporté au tableau II.

TABLEAU II - Schéma de l'administration de molécules marquées au ^{35}S aux arénicoles

Lot	Nombre d'animaux	Produit administré	Quantité mg	Activité mC	Activité spécifique mC/mM	Temps d'expérience
1	9	DL - [^{35}S] cystine	24,90	2,05	19,80	8 h; 24 h
2	9	DL - [^{35}S] cystine	12,73	1,048	19,80	24 h; 48 h
3	8	[^{35}S] sulfite		1,35		24 h; 48 h
4	17	[^{35}S] sulfite	17,60	1,275	10,29	48h; 72h; 96h
5	13	[^{35}S] sulfite	21,476	0,932	5,47	7 h; 16 h

Les animaux reçoivent les produits en suspension (DL-cystine) ou en solution (sulfate et sulfite) dans l'eau de mer, par sondage du tractus digestif et sont maintenus, pendant l'expérience, dans l'eau de mer fréquemment oxygénée, à $+2^\circ$ (chambre froide).

Les animaux appartenant à un type d'essai sont repartis en deux ou trois lots, pour être sacrifiés à des intervalles de temps différentes (voir tableau II), ce qui permet de suivre d'éventuelles variations quantitatives des produits repérés dans les extraits. Les vers sont ouverts vivants par coupe longitudinale de la paroi musculaire; le liquide coelomique et les tissus sont recueillis et traités séparément.

2° Traitement des urines des rats et des tissus des arénicoles.

a) *Rats*. - (1) Purification préalable. Fractionnement par résines échangeuses d'ions. Les urines recueillies, additionnées de taurocyamine utilisée comme entraîneur (0,1 mg/ml urine), sont incubées pendant 1 heure à $+30^\circ$ avec de l'uréase (0,01 g/ml urine). Après acidification et chauffage au bain-marie bouillant, les urines sont déféquées par l'acide perchlorique 2 M (concentration finale : 0,746 M). On laisse décanter 1 heure à 0° , on centrifuge et on neutralise le liquide surnageant par addition de KOH 4 M (pH final 7,2); après une nuit à -10° , on centrifuge à nouveau. Le liquide surnageant est recueilli et dilué avec de l'eau distillée bouillie puis passé à $+2^\circ$ sur permutite 50, forme H^+ (environ 4 volumes par rapport aux volumes d'urine), dans le double but de purifier davantage l'urine et de séparer les dérivés acides de ceux neutres ou basiques. L'effluent que nous appelons *Fraction H_2O* renferme tous les corps acides tandis que les dérivés neutres ou basiques sont élués par l'ammoniaque : on obtient ainsi une deuxième fraction que nous appelons *Fraction NH_4OH* .

(2) *Fraction H₂O* : Après le passage du produit brut, la résine est lavée à l'eau distillée bouillie jusqu'à réaction négative au réactif à l' α -naphtol-diacétyl. Le filtrat et les eaux de lavage réunis sont passés sur amberlite IR 45, forme OH⁻ (volume de résine égal à celui de la permutite) et la résine est ensuite lavée avec un volume d'eau distillée. L'effluent et les eaux de lavage de l'amberlite réunis sont concentrés sous pression réduite. La tauramine et la taurine, contenues dans cette fraction, sont séparées par ionophorèse sur papier (NH₄OH M), les électrophorégrammes sont élués à l'eau et les éluats concentrés soumis à radiochromatographie sur papier.

(3) *Fraction NH₄OH* : la permutite est éluee à l'ammoniaque 2 N à + 2° jusqu'à réaction négative à l' α -naphtol-diacétyl; l'éluat est ensuite concentré sous pression réduite et sous courant d'azote, puis analysé par radiochromatographie sur papier.

b) *Arénicoles*. - (1) Extraction des dérivés guanidiques. Fractionnement des extraits par résines échangeuses d'ions.

Tissus : après pesée, les tissus sont rapidement broyés (waring blender refroidi) en présence de 2 vol. d'acide acétique à 2%. L'homogénat est ensuite porté au bain-marie bouillant pendant 5 min. Après refroidissement on centrifuge à 0° et l'on soumet les résidus à un deuxième broyage et les broyats sont réextraits avec 2 vol. d'acide acétique à 1%. Les extraits réunis sont soumis au fractionnement sur résines.

Liquide coelomique : le liquide coelomique acidifié à l'acide acétique concentré (concentration finale : 2%) est porté au bain-marie bouillant pendant 5 min. Après centrifugation, le résidu est réextrait avec 1 volume d'acide acétique à 1%. Les extraits réunis sont fractionnés sur résine. Ils sont passés à + 2° sur permutite 50, forme H⁺ (environ 3 volumes par rapport au poids pour les tissus, 4 volumes pour le liquide coelomique, plus chargé en sels). La résine est lavée à l'eau distillée bouillie jusqu'à réaction négative à l' α -naphtol-diacétyl.

(2) *Fraction H₂O* : Le filtrat et les eaux de lavage réunis sont passés sur amberlite IR 45, forme OH⁻ (volume de résine égal à celui de la permutite) et la résine lavée avec un volume d'eau distillée. L'effluent et le liquide de lavage réunis sont concentrés sous pression réduite et analysés par radiochromatographie sur papier.

(3) *Fraction NH₄OH* : La permutite est éluee à l' NH_4OH 2 N à + 2° jusqu'à disparition de corps réagissant avec l' α -naphtol-diacétyl et les éluats, après concentration sous pression réduite en courant d'azote, sont analysés par radiochromatographie sur papier.

III. RESULTATS

a) *Rats*. - Des essais préliminaires réalisés sur l'urine de rat n'ayant reçu aucun traitement et additionnée d'hypotaurocyamine (extrait aqueux de muscle de phascolosme) nous ont montré que le procédé analytique adopté permettait de mettre en évidence d'une part la taurocyamine dans la fraction aqueuse de la permutite et d'autre part l'hypotaurocyamine dans celle ammoniacale, dans le cas où des quantités de cette dernière décelables par chromatographie sur papier étaient présentes.

Les essais réalisés avec la [^{35}S]cystine ont montré une faible incorporation de la radioactivité dans la taurine, donnée confirmée après purification ultérieure de la fraction aqueuse de la permutite; un deuxième passage sur la même résine et des tentatives de purification à l'éthanol à froid ont été effectués de façon à pouvoir obtenir une séparation plus nette par chromatographie. D'autre part, des radioautogrammes des mêmes extraits ont donné des résultats concordants avec ceux des comptages au compteur de GEIGER-MÜLLER.

Quant à la taurocyamine, aucune radioactivité n'a pu être décelée au niveau des taches correspondant à son R_f .

Un corps inconnu, faiblement radioactif, qui n'a pas été identifié, réagissant avec l' α -naphtol-diacytyle et migrant près du front du solvant dans le phénol saturé d'eau, a été mis en évidence; son R_f n'a pu être déterminé avec précision, ses taches étant allongées et mal délimitées.

A l'occasion de ces essais, l'élution de la permutite est d'abord effectuée à l'acide chlorhydrique N/500, puis à l'ammoniacque 2 N, ceci afin d'obtenir une séparation de l'hypotaurine et, éventuellement, de l'hypotaurocyamine des autres dérivés de pK nettement basique. Dans la première fraction on a trouvé un corps radioactif, ayant des R_f de 0,36 dans le phénol saturé d'eau et de 0,21 dans le mélange pyridine-isoamylol-acide acétique-eau, voisins de ceux de la taurine (respectivement égaux à 0,32 et 0,20), réagissant avec la ninhydrine. La taurine n'étant pas présente dans cette fraction et les R_f de l'hypotaurine dans les deux solvants étant différents (respectivement égaux à 0,58 et 0,14), on peut exclure qu'il s'agit de l'hypotaurine.

Dans la fraction ammoniacale de la permutite, l' α -naphtol-hypobromite alcalin ne met en évidence que deux corps, non radioactifs, dont les R_f dans le phénol-eau sont respectivement 0,66 et 0,79.

Parmi les essais avec le [^{35}S]sulfite, celui réalisé sur le lot 4 a donné des résultats positifs : dans la fraction aqueuse de la permutite on a pu déceler sur les chromatogrammes un faible marquage de la taurocyamine; on a compté dans la fraction correspondante 3×10^3 c m par rapport à $17,025 \times 10^7$ c m administrés. La taurine n'a pu être analysée, car dans nos

conditions d'ionophorèse elle n'est plus réperable sur les papier. Dans le fraction ammoniacale, de petites quantités d'un corps ayant les mêmes R_f que l'hypotaurine dans plusieurs solvants ont également été trouvés marquées.

Ni l'essai sur le lot 3 ni celui sur le lot 5 n'ont donné de résultat positif.

b) *Arénicoles*. - Les essais réalisés avec la [³⁵S]cystine ont donné les résultats suivants. La fraction aqueuse de la permutite relative aux extraits des tissus, mais non celle du liquide coelomique, renferme constamment de la taurine marquée : des essais de 8 heures à ceux de 48 heures les valeurs de la radioactivité sont sensiblement uniformes. Ce fait a été vérifié en rechromatographiant les éluats de chromatogrammes préparatifs. On a également mis en évidence dans la même fraction le marquage d'un corps non encore identifié, qui réagit à la fois à la ninhydrine et à l' α -naphtol-hypobromite alcalin, et dont le R_f dans le phénol saturé d'eau est 0,86-0,88 (deuxième chromatographie après élution de chromatogrammes préparatifs).

Un marquage de la taurocyamine n'a jamais été mis en évidence. Dans la fraction ammoniacale des extraits tissulaires, on note, à côté de divers dérivés non identifiés réagissant avec la ninhydrine, une tache d'hypotaurine marquée.

Les essais réalisés à l'aide du [³⁵S]sulfate et du [³⁵S]sulfite n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de taurocyamine ou d'hypotaurocyamine marquées; ce qui nous a conduit à étudier systématiquement la répartition de la radioactivité dans les tissus de l'Aréniccole injectée avec le [³⁵S]sulfite (Tableau III). Le protocole adopté consiste, après l'extraction

TABLEAU III - *Repartition de la radioactivité dans les extraits des tissus d'arénicoles, après administration de [³⁵S] sulfite*

Tissus	Essai	Extraits acétiques bruts	Résidus lipo - protéiques			
			Activité totale **	Extrait alcool-éther*	Extrait CHCl ₃ *	Extrait aqueux *
Liquide coelomique	7 h	21,80				
	16 h	14,75				
Tissus	7 h	8,76	2,84	0,034	0,0195	98,40
	16 h	4,35	1,46			

Radioactivité exprimée en % de la dose administrée à chaque groupe d'animaux.
* Radioactivité exprimée en % de la radioactivité des résidus.

** Activité dosée sur échantillons de la poudre, après minéralisation sèche sur KOH.

Protocole expérimental. - 13 arénicoles (lot n° 5 - voir tableau II) reçoivent par sondage du tractus digestif 21,476 mg [³⁵S] sulfite, ayant une activité totale de 0,932 mC (activité spécifique: 5,47 mC/mM), en solution dans l'eau de mer. Les animaux sont répartis en deux groupes, 7 et 6 exemplaires, qui sont sacrifiés l'un 7 h, l'autre 16 h après administration du produit marqué. Pour chaque groupe, le liquide coelomique et l'ensemble des tissus sont recueillis et traités séparément. Après extraction à l'acide acétique dilué, les résidus insolubles sont soumis à l'extraction à l'éthanol-éther (1 : 1) puis, après hydrolyse acide (ClH 6 N dans méthanol) et dissolution dans l'eau, à une dernière extraction au chloroforme.

acétique initiale, commune à tous les essais, à analyser particulièrement les résidus insolubles. Ceux-ci sont desséchés sous vide sur P_2O_5 , finement triturés au mortier puis pesés. On extrait 3 heures la poudre à l'éthanol absolu-éther (1 : 1) dans un appareil à extraction continue et l'on dose ensuite la radioactivité de l'extrait. Le résidu délipidé est ensuite soumis à hydrolyse acide, selon la méthode décrite par WILSON et coll. (112); pour cela il est dissous dans 10 volumes ClH 6 N dans le méthanol et traité à reflux durant 3 h. Le mélange alcool- ClH est évaporé sous pression réduite et le résidu desséché sous un courant d'air est dissous dans l'eau; la solution est extraite trois fois, chaque fois avec un volume égal de $CHCl_3$. Le volume des extraits chloroformiques réunis et celui de la phase aqueuse sont mesurés et la radioactivité de chacune des fractions déterminée.

La plus grande partie de la radioactivité se retrouve dans la phase aqueuse. Celle-ci est passée sur une petite colonne d'amberlite IR 45, forme OH^- . L'effluent de la résine ne renferme que de faibles quantités de radioactivité.

La chromatographie sur papier de l'extrait acétique (7h, tissus) permet d'individualiser, parmi plusieurs dérivés réagissant avec la ninhydrine, la cystine et quelques corps réagissant avec l' α -naphthol-hypobromite.

IV. DISCUSSION DES RESULTATS

De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort qu'après administration à des rats de $DL-[^{35}S]$ cystine ou de $[^{35}S]$ sulfite, le marquage des dérivés aminés et guanidiques n'est pas toujours parallèle. Avec la $[^{35}S]$ cystine, la taurine urinaire est bien marquée, mais non la taurocystamine. Avec le $[^{35}S]$ sulfite l'hypotaurocystamine comme la taurocystamine sont marquées, quoique très faiblement. Les essais 3 et 5 ne sont pas significatifs, le premier parce que l'activité spécifique du $[^{35}S]$ sulfite utilisé est trop faible, le second parce que les dérivés aminés ou guanidiques ne sont marqués ni les uns ni les autres.

L'absence de concomitance dans le marquage des dérivés aminés et guanidiques est patente chez les arénicoles. Aussi bien avec la $[^{35}S]$ cystine qu'avec le $[^{35}S]$ sulfite ou sulfate, la taurine et l'hypotaurocystamine sont marquées, alors que la taurocystamine comme l'hypotaurocystamine ne le sont jamais.

De prime abord, on pourrait déduire de ces faits que les produits guanidiques ne dérivent pas des amines correspondantes. Si tel est le cas, le marquage devrait être en effet toujours parallèle entre les deux types de produits. Toutefois, le marquage des métabolites soufrés peut être altéré par les réactions d'échange auxquelles donnent lieu les groupes SH , SO_3^- , SO_3 , fixés à des chaînes carbonées. L'incorporation du sulfite et du sulfate dans les métabolites est connue depuis longtemps (25,27,47). De plus, il y a échange

entre composés minéraux et organiques (39,34,35). Récemment RATSISALOVANINA, CHAPEVILLE et FROMAGEOT ont montré que le pyridoxal ou son dérivé phosphorylé est capable, en présence d'un métal et en l'absence de tout enzyme, d'opérer la désulphydratation et la β -substitution de la cystéine avec des molécules renfermant du soufre réducteur (sulfure, sulfite, cystéine), réaction normalement catalysée par la cystéinylase (68,30). On comprend que de telles réactions soient susceptibles de détacher les groupes soufrés des métabolites qui les portent et, par suite, d'altérer profondément le marquage par ^{35}S .

La comparaison des résultats obtenus avec les rats traités par la DL- ^{35}S]cystine (lots 1 et 2) et le ^{35}S]sulfite (lot 4) est instructive à cet égard. Après administration du premier produit la taurine est marquée mais non la taurocynamine, tandis que après administration de sulfite radioactif le dérivé guanidique est marqué. Ces résultats, apparemment contradictoires, ne peuvent s'expliquer que par l'existence de réactions d'échange entre les groupes soufrés.

RESUME ET CONCLUSIONS

1. La taurocynamine, isolée par fractionnement sur résines échangeuses d'ions et par chromatographie sur papier de l'urine de rats ayant reçu du sulfite, du sulfate et de la cystine marqués par ^{35}S , présente un faible marquage dans le cas des rats traités au sulfite. Chez les rats traités à la ^{35}S]cystine, la taurocynamine n'est pas marquée, alors que la taurine urinaire est radioactive.

2. Chez les arénicoles ayant reçu les mêmes produits marqués, on peut mettre en évidence la présence de taurine et d'hypotaurocynamine radioactives dans les tissus; en aucun cas la taurocynamine ni l'hypotaurocynamine ne sont marquées.

3. Les réactions d'échange des groupes soufrés portés par les métabolites peuvent expliquer les résultats obtenus. En tout état de cause, les données établies montrent que le marquage par ^{35}S des précurseurs éventuels des guanidines soufrées ne permet pas de suivre la biogénèse de ces dernières.

TROISIEME PARTIE

ETUDE DE L'ORIGINE DU GROUPEMENT AMIDINE, DU LIEU DE SYNTHÈSE ET DE L'ORDRE DE FORMATION DE LA TAUROCYAMINE ET DE L'HYPOTAUROCYAMINE.

I. INTRODUCTION. OBJET DES RECHERCHES.

Parallèlement à l'étude des précurseurs soufrés de la taurocyamine, réalisée à l'aide de composés marqués à ^{35}S , nous avons abordé celle de l'origine de son groupement amidine, chez des animaux dont les tissus sont riches en ce dérivé.

Des essais préliminaires effectués sur l'Arénicole au moyen de l'[ami-dino- ^{14}C] arginine ayant montré une incorporation active de la radioactivité dans la taurocyamine et l'hypotaurocyamine, nous avons étudié la formation de ces deux corps parallèlement dans l'Arénicole, riche en taurocyamine et pauvre en hypotaurocyamine, et dans le Phascolosome, qui au contraire, est riche en dérivé sulfinique et moins riche en produit sulfonique.

Le rapport d'activité spécifique des deux corps doit permettre de saisir le terme de passage de l'un à l'autre. Par ailleurs, l'analyse radiochromatographique systématique peut mettre éventuellement en évidence la présence des précurseurs immédiats ou lointains, ou celle de corps voisins qui prennent naissance au cours de la formation de la taurocyamine ou de l'hypotaurocyamine.

II. PARTIE EXPERIMENTALE.

1° *Traitement des animaux.* Les animaux reçoivent, par sondage du tractus digestif ou par injection dans la cavité coelomique, de l'arginine marquée en solution dans l'eau de mer; ils sont maintenus, pendant l'expérience, dans l'eau de mer fréquemment oxygénée, à $+2^\circ$ (chambre froide).

Le temps de l'expérience écoulé, les vers sont ouverts vivants par coupe longitudinale de la paroi musculaire et le liquide coelomique, le muscle et l'ensemble des tractus (digestif et génital) soigneusement disséqués, sont recueillis séparément. En même temps, la radioactivité éliminée dans l'eau du milieu est mesurée.

2° *Extraction des dérivés guanidiques.* a) Muscle et tractus. — Après pesée, les tissus sont broyés à -5° au mortier à l'aide de sable de Fontainebleau lavé et repris avec 2 volumes d'acide acétique à 2% (préparé avec de l'eau distillée bouillie). On porte l'homogénat au bain-marie bouillant pendant 10 min., on centrifuge, on réserve le liquide surnageant et l'on soumet les résidus à un deuxième broyage au mortier et à une deuxième extraction avec deux volumes d'acide acétique à 1%. Après centrifugation, le nouvel extrait est réuni au premier et la radioactivité totale est mesurée.

b) Liquide coelomique. - Le liquide coelomique acidifié à l'acide acétique concentré (concentration finale: 2%) est porté au bain-marie bouillant pendant 10 min. Après centrifugation, le liquide surnageant est recueilli et le précipité réextrait avec un volume d'acide acétique à 1%. Les extraits sont réunis et la radioactivité totale est mesurée.

3° *Fractionnement des extraits par la permutite et purification des fractions.* Les extraits sont passés à $+2^{\circ}$ sur permutite 50, forme H^{+} (environ 3 volumes de résine par rapport au poids de tissus pour le muscle et les tractus, 4 volumes pour le liquide coelomique). Les résines sont lavées, toujours à la même température, à l'eau distillée bouillie, jusqu'à réaction négative à l' α -naphthol-diacétyle. A la fin du lavage, la radioactivité de l'effluent atteint un niveau très proche du bruit de fond du compteur.

a) *Fraction H_2O :* Les effluents et les eaux de lavage, réunis, sont passés sur amberlite IR 45, forme OH^{-} (volume de résine égal à celui de la permutite), puis la résine est lavée avec un volume d'eau distillée. Les effluents et les liquides de lavage de l'amberlite, réunis, sont concentrés sous pression réduite. Après mesure de la radioactivité, ils sont analysés par radiochromatographie sur papier.

b) *Fraction NH_4OH :* La permutite est éluée à $+2^{\circ}$ à l' NH_4OH 2 N préparée avec de l'eau distillée bouillie, jusqu'à disparition de la radioactivité dans l'effluent. Les éluats sont lyophilisés et les résidus dissous dans de petits volumes d'eau sont soumis à la mesure de la radioactivité.

L'arginine présente dans les éluats est éliminée par passage à $+2^{\circ}$ de ces derniers, préalablement neutralisés et modérément dilués, sur de petites colonnes d'amberlite IRC 50, forme H^{+} (environ 0,5 volumes par rapport au poids initial) et la résine est lavée à l'eau distillée bouillie jusqu'à disparition de la radioactivité dans l'effluent. Les effluents réunis sont lyo-

philisés et les résidus repris avec de petites quantités d'eau sont soumis à la mesure de la radioactivité et analysés par radiochromatographie sur papier.

4° *Analyse radiochromatographique sur papier.* Lors de l'analyse de la fraction aqueuse, une seule chromatographie dans le mélange pyridine-isoamylol-acide acétique-eau suffit pour séparer efficacement les corps marqués, la taurocyamine notamment. Pour l'éluat ammoniacal deux chromatographies successives, la première en pyridine acétique, la seconde en phénol saturé d'eau, sont nécessaires pour obtenir une séparation suffisante des dérivés marqués les plus intéressants. Le premier solvant est susceptible de séparer l'hypotaurocyamine de l'urée, mais non l'hypotaurocyamine d'un dérivé inconnu fortement radioactif, appelé « corps A », chez l'Arénicole, et l'urée d'autres composés marqués, comme le P₁, isolé chez le Phascolosome (74). Ces corps par contre sont séparés par le phénol. On réalise donc une chromatographie préparative en pyridine acétique; après migration, les composés non séparés sont élués et chromatographiés dans le phénol.

Les chromatogrammes analytiques sont soumis au comptage et les lectures rapportées sur diagrammes permettent le calcul des pourcentages de la radioactivité relatifs aux divers pics (voir p. 27).

5° *Détermination de l'activité spécifique de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine.* La taurocyamine et l'hypotaurocyamine sont isolées par chromatographie sur papier des fractions les renfermant, respectivement du filtrat de la permutite, neutralisé par passage sur amberlite IR 45, et de l'éluat ammoniacal de la permutite passé sur amberlite IRC 50. Les solvants déjà utilisés pour l'analyse radiochromatographique (voir 4°) sont employés: la taurocyamine est éluee à partir de chromatogrammes préparatifs en pyridine acétique de l'effluent de l'amberlite IR 45; l'hypotaurocyamine de chromatogrammes préparatifs réalisés d'abord dans le même solvant, puis, après élution, en phénol saturé d'eau. Un contrôle de la pureté des deux produits finaux est effectué par chromatographie sur papier dans plusieurs solvants.

L'activité spécifique est ensuite déterminée par dosages spectrophotométriques des dérivés guanidiques et mesures parallèles de la radioactivité du même éluat. Les dosages spectrophotométriques sont réalisés à l'aide de la réaction au diacétyl- α -naphtol selon ROSENBERG et coll. (79). Les mesures de la radioactivité sont effectuées selon le protocole suivant: pour chaque détermination quatre échantillons du produit marqué sont soumis au comptage par scintillation liquide, d'après la méthode rapportée p. 26. Le bruit de fond est mesuré par plusieurs comptages d'un échantillon ayant la même composition en mélange scintillant-eau-éthanol que les essais, et exprimé

par la moyenne de ces comptages. Des d.p.m. par échantillon on déduit les d.p.m. par unité de poids et par suite l'activité spécifique en d.p.m. par μM du corps examiné.

6° *Dosage de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine dans les tissus de l'Arénicole et du Phascolosome.* Des lots d'arénicoles et de phascolosomes n'ayant reçu aucun traitement sont employés pour le dosage des deux dérivés guanidiques dans leurs tissus (muscle et tractus). Les rapports entre les concentrations de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine dans le même tissu des deux organismes sont préalablement établis par des dosages effectués sur les liquides provenant d'une seule extraction à l'acide acétique dilué et additionné d'acide ascorbique, utilisé dans le but de réduire le taux d'oxydation de l'hypotaurocyamine. Les deux produits sont dosés alors sous forme de taurocyamine dans des extraits trichloroacétiques, après oxydation de l'hypotaurocyamine. Pour cela le muscle et les tractus, soigneusement disséqués et essuyés puis pesés, sont broyés au mortier à froid à l'aide de sable de Fontainebleau lavé. Les homogénats sont extraits avec des solutions glacées d'acide trichloroacétique de concentration décroissante (concentration finale : 1,375%). Les extraits sont portés à des volumes connus et les manipulations successives opérées sur échantillons de 10 ml. Chaque échantillon est oxydé avec de l'eau oxygénée à 5 vol. (1 goutte), puis porté au bain-marie bouillant pendant 10' et neutralisé à l'aide de NaOH 0,5 N. L'arginine présente dans les extraits est éliminée par passage de ceux-ci sur Dowex 50 $\times$ 8, forme H^+ (colonnes de 2 ml par essai). Les résines sont lavées avec 4 volumes d'eau distillée et les effluents et les liquides de lavage sont passés sur amberlite IR 45, forme OH^- (colonnes de volumes égaux de celles de Dowex) dans le but de débarrasser les extraits de l'acide trichloroacétique. L'amberlite est ensuite lavée à l'eau distillée et le lavage est poursuivi jusqu'au volume de 20 ml. Les dosages de la taurocyamine sont effectués sur l'effluent de l'amberlite à l'aide de la réaction à l' α -naphtol-diacétyl, selon la méthode de ROSENBERG et coll. (79).

III. RESULTATS

1° *Répartition de la radioactivité dans les extraits acétiques des tissus.* Voir les tableaux IV e V.

2° *Analyse radiochromatographique des fractions de la permutite.*

a) *Fraction H_2O :* filtrat de la permutite, passé sur amberlite IR 45, chromatographié en pyridine acétique.

TABLEAU IV - *Repartition de la radioactivité dans les extraits des tissus d'arénicoles, après administration de DL-[amidino-¹⁴C] arginine*

Tissus	Lot n°	Extraits bruts	Permutite 50		Effluent Amb. IRC 50 (hpty, hpta)
			Fraction H ₂ O (ty, ta)	Fraction NH ₄ OH (arg, hpty, hpta)	
Liquide	1	1,49	0,006	0,234	
coelomique	2	6,24	0,016	2,67	0,29
Muscle + tractus	1	32,0	0,489	15,57	2,145
Muscle	2	38,10	0,145	27,92	2,77
Tractus	2	5,19	0,019	4,015	0,24

Radioactivité exprimée en % de la dose administrée.

Protocole expérimental. - Lot 1: 5 arénicoles reçoivent par sondage du tractus digestif 7,92 mg DL-[amidino-¹⁴C] arginine ayant une activité totale de 0,0834 mC (activité spécifique 2,2 mC/mM) en solution dans de l'eau de mer, pH 6,5. Les animaux sont ouverts vivants 16 heures après l'administration du produit marqué et le liquide coelomique et l'ensemble des tissus (muscle et tractus) sont recueillis séparément. Lot. 2: 6 arénicoles reçoivent, par injection dans la cavité coelomique, 9,5 mg DL-[amidino-¹⁴C] arginine ayant une activité totale de 0,1 mC (activité spécifique: 2,2 mC/mM) en solution dans de l'eau de mer, pH 6,5. Expérience de 9 heures; liquide coelomique, muscle et tractus (digestif et génital) recueillis et traités séparément.

Les différents matériaux biologiques sont extraits à l'acide acétique dilué et les extraits bruts fractionnés sur permutite 50, forme H⁺: a) fraction H₂O ou filtrat, renfermant la taurocyamine (ty) et la taurine (ta); b) fraction NH₄OH ou éluat ammoniacal, renfermant l'hypotaurocyamine (hpty), l'hypotaurine (hpta) et l'arginine (arg). Cette dernière fraction est débarrassée de l'arginine par passage sur amberlite IRC 50, forme H⁺. Pour d'autres détails, voir le texte.

TABLEAU V - *Repartition de la radioactivité dans les extraits des tissus de phascolosomes, après administration de DL-[amidino-¹⁴C] arginine*

Tissus	Extraits bruts	Permutite 50		Effluent Amb. IRC 50 (hpty, hpta)
		Fraction H ₂ O (ty, ta)	Fraction NH ₄ OH (arg, hpty, hpta)	
Liquide coelomique	53,80	0,0078	46,87	2,07
Muscle	15,53	0,052	15,09	0,77
Tractus digestif et génital	19,50	0,082	18,49	1,30

Radioactivité exprimée en % de la dose administrée.

Protocole expérimental. - 10 phascolosomes reçoivent par injection dans la cavité coelomique 9,5 mg DL-[amidino-¹⁴C] arginine ayant une activité totale de 0,1 mC (activité spécifique: 2,2 mC/mM) en solution dans de l'eau de mer, pH 6,7. Les animaux sont ouverts vivants 9 h après administration du produit marqué, le liquide coelomique, le muscle et les tractus sont recueillis et traités séparément. Les différents matériaux biologiques sont extraits à l'acide acétique dilué et les extraits bruts fractionnés sur permutite 50, forme H⁺: a) fraction H₂O ou filtrat, renfermant la taurocyamine (ty) et la taurine (ta); b) fraction NH₄OH ou éluat ammoniacal, renfermant l'hypotaurocyamine (hpty), l'hypotaurine (hpta) et l'arginine (arg). Cette dernière fraction est débarrassée de l'arginine par passage sur amberlite IRC 50, forme H⁺ (amb. IRC 50). Pour d'autres détails, voir le texte.

α) *Arénicoles*: Aussi bien dans les extraits des tissus totaux que dans ceux de muscle et des tractus, la révélation à l' α -naphthol-hypobromite alcalin met en évidence une tache de forte intensité dont le R_f correspond à celui de la taurocyamine de référence. Les diagrammes de comptage à scintillation liquide (tissus totaux : fig. 1; muscle : fig. 2; tractus : fig. 3) montrent la superposition exacte d'un pic, plus ou moins important, à la tache révélée. La révélation à la ninhydrine et celle à la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde montrent la présence de deux corps, non identifiés et non marqués, réagissant avec les deux réactifs, de R_f 0, 10-0, 14 et 0, 20-0, 21.

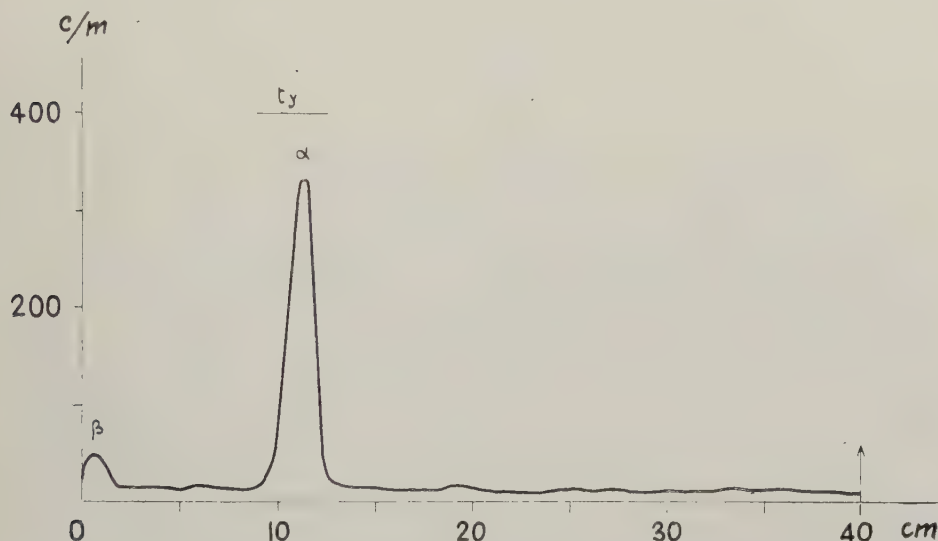


FIG. 1. Comptage par scintillation liquide d'un chromatogramme (pyridine-isoamylol-acide acétique-eau, 80 : 40 : 10 : 40) du filtrat de la permutite 50 (H^+) (fraction H_2O), passé ensuite sur amberlite IR 45 (OH^-) de l'extrait acétique des tissus d'Arénicole après administration de DL-[amidino- ^{14}C] arginine.

Le pic α , correspondant à la taurocyamine (ty), renferme 91,6% de la radioactivité totale repérée dans la fraction chromatographiée.

Odonnées : radioactivité mesurée (coups/min).

Abscisses : longueur du chromatogramme (cm).

β) *Phascolosomes*: Avec les extraits de muscle et de tractus, l' α -naphthol-hypobromite alcalin révèle une tache de faible intensité, de R_f correspondant à celui de la taurocyamine témoin. La radioactivité correspondante n'est pas décelable par comptage des chromatogrammes. Les bandes des mêmes chromatogrammes révèlent, à la ninhydrine et à la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde, plusieurs taches non radioactives.

b) Fraction NH_4OH : éluat ammoniacal de la permutite passé sur amberlite IRC 50, chromatographié en pyridine acétique.

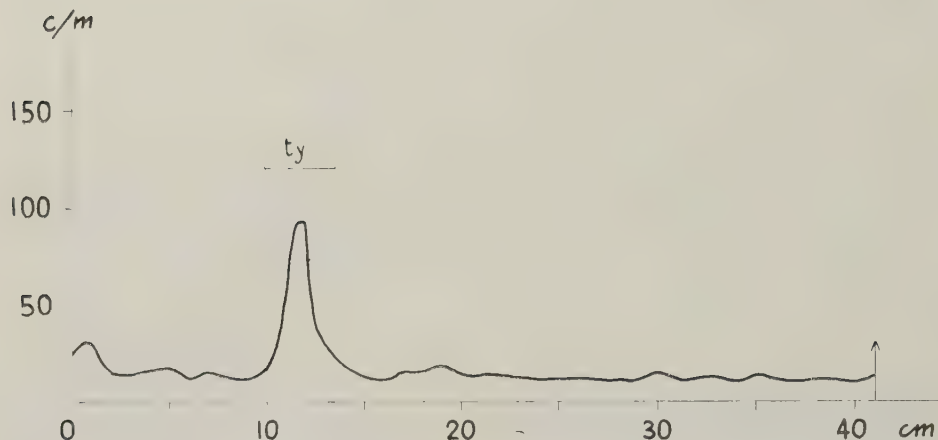


FIG. 2. Comptage par scintillation liquide d'un chromatogramme (pyridine-isoamylol-acide acétique-eau, 80 : 40 : 10 : 40) du filtrat de la permutite 50 (H⁺) (fraction H₂O) passé sur amberlite IR 45 (OH⁻) de l'extrait de muscle d'Arénicole après administration de DL-[amidino-¹⁴C] arginine.

Le pic coïncidant avec la tache de la taurocyamine (ty) renferme 75,4% de la radioactivité totale repérée dans la fraction chromatographiée.

Odonnées : radioactivité mesurée (coups/min).

Abscisses : longueur du chromatogramme (cm).

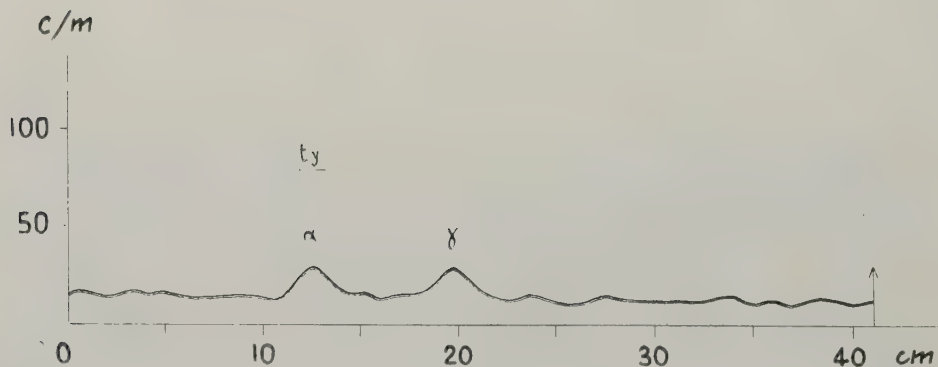


FIG. 3. Comptage par scintillation liquide d'un chromatogramme (pyridine-isoamylol-acide acétique-eau, 80 : 40 : 10 : 40) du filtrat de la permutite 50 (H⁺) (fraction H₂O) passé sur amberlite IR 45 (OH⁻) de l'extrait acétique des tractus d'Arénicole, après administration de DL-[amidino-¹⁴C] arginine.

Le pic α, coïncidant avec la tache de la taurocyamine (ty), renferme 50,0% de la radioactivité totale repérée dans la fraction chromatographiée. Le pic γ, ne se superpose à aucune des taches révélées à l'α-naphtol-hypobromite alcalin.

Odonnées : radioactivité mesurée (coups/min).

Abscisses : longueur du chromatogramme (cm).

α) *Arénicoles*:

sous-fraction hypotaurocyamine: A côté d'une tache intense révélée à l' α -naphtol-hypobromite et dont le R_f correspond à celui de l'hypotaurocyamine de référence et de traces de taurocyamine, provenant de l'oxydation de la première au cours des manipulations, on peut mettre en évidence soit

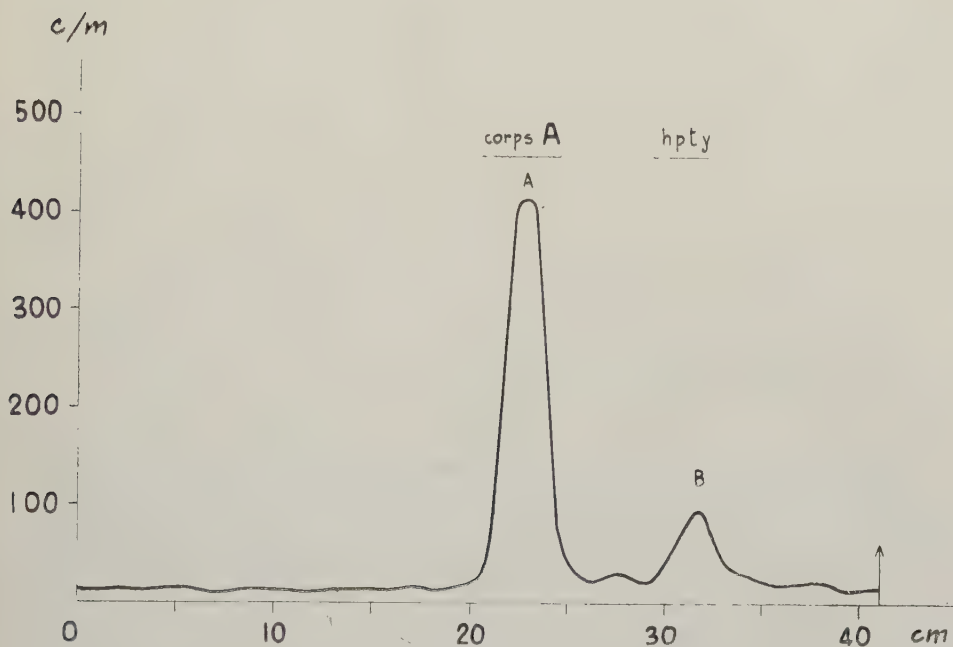


FIG. 4. Comptage par scintillation liquide d'un chromatogramme (phénol saturé d'eau) renfermant l'hypotaurocyamine. Extrait acétique de tissus d'Arénicole ayant reçu DL-[amidino- ^{14}C] arginine, passé sur permutite 50 (H^+), élué à NH_4OH , repassé sur amberlite IRC 50 (H^+), puis chromatographié en pyridine-isoamylol-acide acétique-eau, (80 : 40 : 10 : 40). L'éluat de cette dernière chromatographie préparative est chromatographié en phénol saturé d'eau pour être compté.

Le pic A, superposé au corps réagissant avec la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde et la ninhydrine («corps A»), renferme 78% de la radioactivité. Le pic B, coïncidant avec la tache de l'hypotaurocyamine (hpty), renferme 13 à 20 % de la radioactivité totale repérée dans la fraction chromatographiée, suivant les essais.

Odonnées : radioactivité mesurée (coups/min).

Abscisses : longueur du chromatogramme (cm).

dans le muscle soit dans le tractus un corps nouveau constamment marqué que nous avons essayé de caractériser. Les diagrammes de comptage par scintillation liquide montrent la présence de deux pics, se superposant au dérivé inconnu et à l'hypotaurocyamine (figs. 4 et 5).

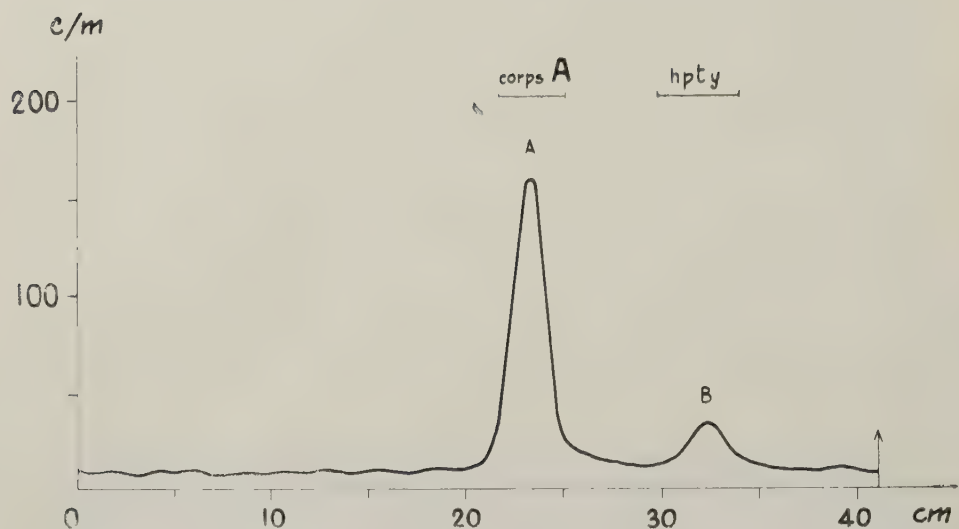


FIG. 5. Voir légende de la figure 4.

Ce corps nouveau que nous appelons « corps A » est fixé par la permutite 50, forme H^+ , donc de caractère neutre ou basique. Il renferme des groupements aminés primaires (réaction à la ninhydrine) et carbamylés (réaction à la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde). Les R_f de ce corps dans quelques solvants, en chromatographie descendante, sont portés au tableau VI.

TABLEAU VI - R_f du corps A dans divers solvants

Solvants	R_f
1. Phenol saturé d'eau	0,54 - 0,56
2. <i>n</i> - Butanol - acide formique - eau (75 : 15 : 10)	0,14
3. <i>n</i> - Butanol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5)	0,18
4. <i>n</i> - Butanol - acide acétique - eau (73 : 10 : 17)	0,14
5. Pyridine - isoamylol - acide acétique - eau (80 : 40 : 10 : 40)	0,16 - 0,21

Sous-fraction urée: La révélation à la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde permet d'observer uniquement dans les tractus une tache dont le R_f correspond exactement à celui de l'urée témoin et dont la radioactivité est marquée par la hauteur du pic de la figure 6.

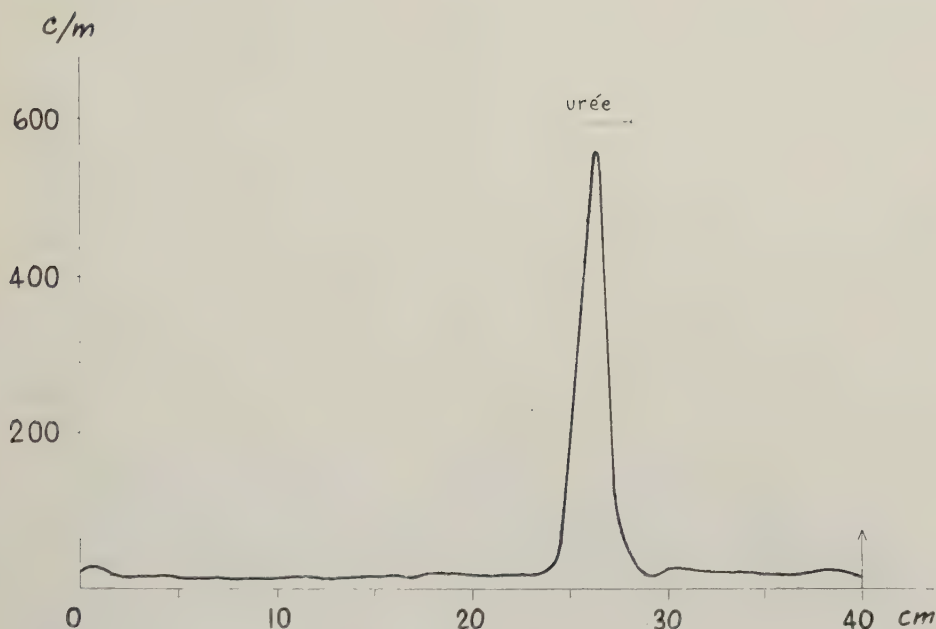


FIG. 6. Comptage par scintillation liquide d'un chromatogramme renfermant l'urée. L'extrait des tractus d'Arénicole, après administration de DL-[amidino- ^{14}C] arginine, est passé sur permutite 50 (H^+), élué à NH_4OH , chromatographié en pyridine-isoamylol-acide acétique-eau (80 : 40 : 10 : 40). L'éluat de cette dernière chromatographie préparative est chromatographié en phénol saturé d'eau pour être compté.

Le pic, superposé au corps réagissant avec la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde et identifié à l'urée, renferme 98,4% de la radioactivité totale repérée dans la fraction chromatographiée.

Données : radioactivité mesurée (coups/min).

Abscisses : longueur du chromatogramme (cm).

β) Phascolosomes :

sous-fraction hypotaurocyamine : Avec les extraits de muscle et de tractus, la révélation à l' α -naphtol-hypobromite alcalin ne met en évidence qu'une seule tache, très intense, de même R_f que celui de l'hypotaurocyamine de référence, à côté de traces de taurocyamine. Les diagrammes de comptage (figs. 7 et 8) montrent, dans le cas du muscle, deux pics dont le premier à partir de l'origine est exactement superposé à la tache d'hypotaurocyamine, et, dans le cas des tractus, quatre pics, dont le plus important coïncide avec la tache d'hypotaurocyamine, les autres avec des corps à ninhydrine positive ou à ninhydrine et à *p*-diméthylaminobenzaldéhyde positives.

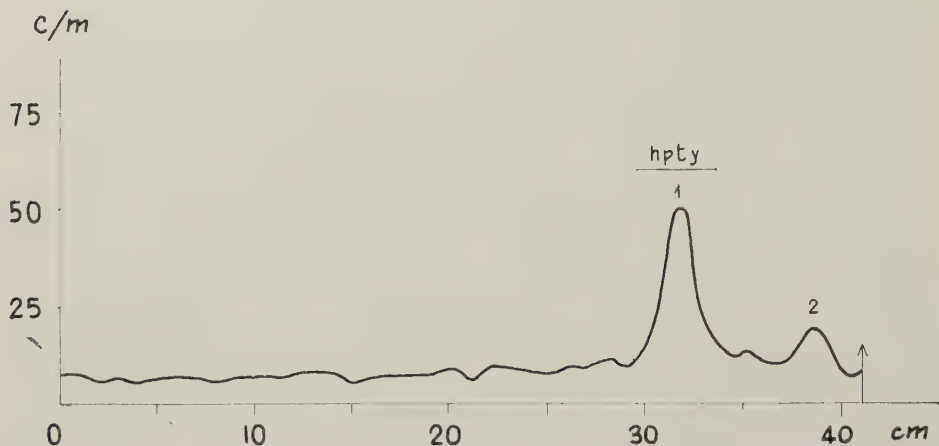


FIG. 7. Comptage par scintillation liquide d'un chromatogramme renfermant l'hypotaurocyamine. L'extrait de muscle de Phascolosome, après administration de DL-[amidino- ^{14}C] arginine, est passé sur permutite 50 (H^+), élué à NH_4OH , chromatographié en pyridine-isoamylol-acide acétique eau (80 : 40 : 10 : 40). L'éluat de cette dernière chromatographie préparative est chromatographié en phénol saturé d'eau pour être compté.

Le pic 1, coïncidant avec la tache de l'hypotaurocyamine (hpty), renferme 76,1% et le pic 2, ne coïncidant avec aucune des taches révélées, renferme 18% de la radioactivité totale de la fraction chromatographiée.

Odonnées : radioactivité mesurée (coups/min).

Abscisses : longueur du chromatogramme (cm).

Sous-fraction urée: Avec les extraits de muscle et de tractus, la révélation à la *p*-diméthylaminobenzaldéhyde permet d'observer une tache, de R_f correspondant à celui de l'urée de référence, tandis que l' α -naphthol-hypobromite met en évidence un corps non encore identifié. Ce corps, constamment retrouvé dans l'éluat ammoniacal de la permutite 50, forme H^+ , appelé « P_3 », se situe à la troisième place, à partir de l'origine, après l'hypotaurocyamine et la taurocyamine. Le diagramme de comptage (fig. 9) montre deux pics, coïncidant respectivement avec l'urée et le composé « P_3 ».

3° Analyse quantitative.

a) Dosage de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine dans les tissus de l'Arénicole et du Phascolosome: L'étude quantitative de la répartition des dérivés guanidiques dans les tissus de l'Arénicole et du Phascolosome (Tableau VII) montre que la teneur du muscle en guanidines totales (taurocyamine + hypotaurocyamine) comparable chez les deux vers, est environ 7 fois plus élevée dans le muscle que dans le tractus. La concentration en taurocyamine et en hypotaurocyamine du muscle et du tractus, calculée

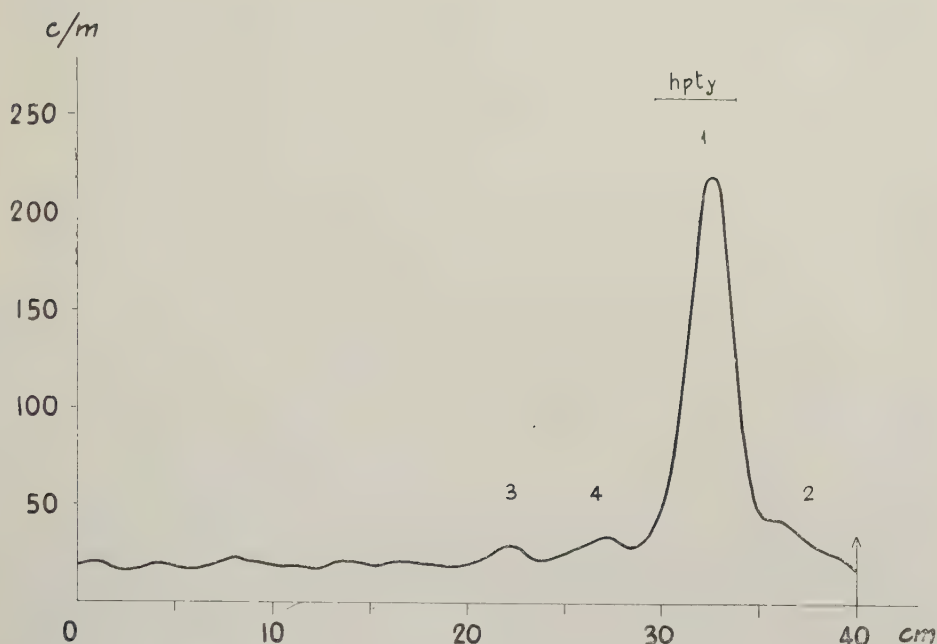


FIG. 8. Comptage par scintillation liquide d'un chromatogramme renfermant l'hypotaurocyamine. L'extrait de tractus de Phascolosome, après administration de DL-[amidino- ^{14}C] arginine, est passé sur permutite 50 (H+), élué à NH_4OH , repassé sur amberlite IRC 50 puis chromatographié en pyridine-isoamylol-acide acétique-eau (80 : 40 : 10 : 40). L'éluat de cette dernière chromatographie préparative est ensuite chromatographié en phénol saturé d'eau pour être compté.

Le pic 1, coïncidant avec la tache d'hypotaurocyamine (hpty), renferme 86,0% de la radioactivité totale de la fraction chromatographiée. Le pic 2 ne correspond à aucune des taches révélées; le pic 3 à un corps inconnu à ninhydrine positive, et le pic 4 à un autre composé inconnu réagissant à la ninhydrine et à la p-diméthylaminobenzaldéhyde. Ces trois pics renferment respectivement 5,56, 2,43 et 5,99% de la radioactivité de la fraction étudiée.

Odonnées : radioactivité mesurée (coups/min).

Abscisses : longueur du chromatogramme (cm).

d'après les rapports taurocyamine/hypotaurocyamine déterminés dans ces tissus, est sensiblement inversée de l'Arénicole au Phascolosome; ces rapports s'établissent sur la base approximative de 10/1 dans le muscle et dans le tractus, le dérivé dominant étant la taurocyamine chez l'Arénicole et l'hypotaurocyamine chez le Phascolosome.

b) Répartition de la radioactivité dans les dérivés isolés par fractionnement sur résine et par chromatographie sur papier des extraits bruts: Les mesures de la radioactivité effectuées sur les chromatogrammes analytiques permettent de définir sa répartition parmi les corps caractérisés dans les extraits tissulaires des deux animaux étudiés (Tableau VIII).

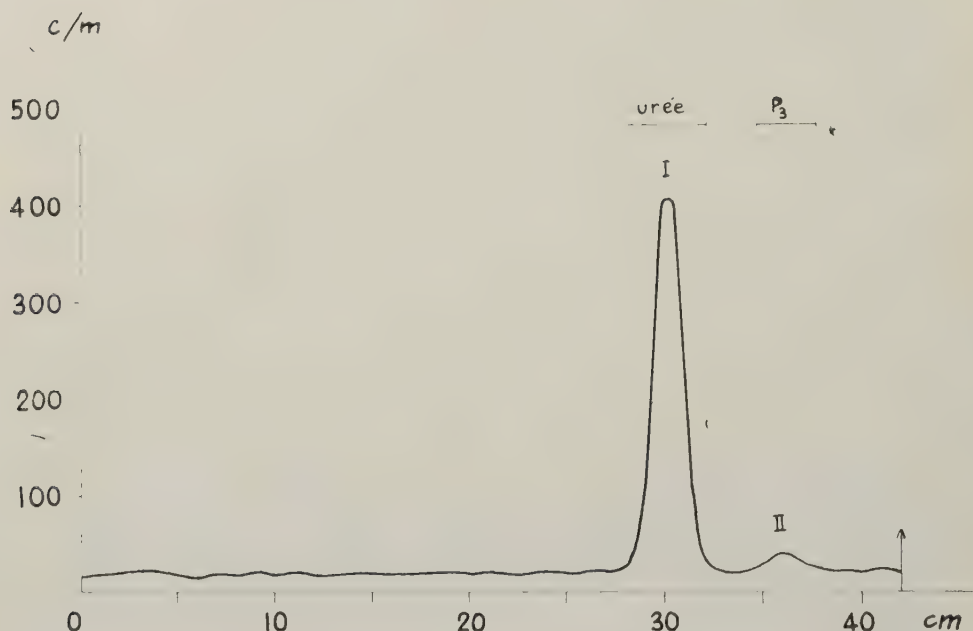


FIG. 9. Comptage par scintillation liquide d'un chromatogramme renfermant l'urée. L'extrait de tractus de *Phascolosoma*, après administration de DL-[amido-¹⁴C] arginine, est passé sur permutite 50 (H⁺), élué à NH₄OH, puis chromatographié en phénol saturé d'eau pour être compté.

Le pic 1, coïncidant avec la tache de l'urée, révélée à la *p*-diméthylamino-benzaldéhyde, renferme 96,9% et le pic 2, correspondant à une tache de dérivé guanidique (P₃), 4,06% de la radioactivité totale de la fraction chromatographiée.

Odonnées : radioactivité mesurée (coups/min).

Abscisses : longueur du chromatogramme (cm).

TABLEAU VII - Concentration de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine dans les tissus de l'*Arénicole* et du *Phascolosome*

Espèces	Tissus	Dérivés guanidiques (pour 1 g tissu frais)				
		ty		hpty		ty + hpty
		mg	μmoles	mg	μmoles	mg
<i>Arenicola marina</i> L.	Muscle	2,432	14,56	0,243	1,60	2,675
	Tractus	0,324	1,94	0,047	0,31	0,371
<i>Phascolosoma vulgare</i> Blainville	Muscle	0,247	1,42	2,475	16,31	2,723
	Tractus	0,045	0,27	0,330	2,18	0,375

TABLEAU VIII - *Repartition de la radioactivité dans les dérivés guanidiques et dans quelques dérivés carbamylés, isolés par fractionnement sur résines échangeuses d'ions et par chromatographie sur papier, des extraits d'arénicoles et de phascolosomes, après administration de DL-[amidino-¹⁴C] arginine.*

Espèces	Tissus	Dérivés guanidiques			Dérivés carbamylés	
		ty	hpty	P ₃ *	urée	corps A**
<i>Arenicola marina</i> L.	Muscle +	91,60	7,13 à	—	35,90	42,81 à
	Tractus		10,98			46,60
	Tractus	****	21,83		39,06 ***	—
<i>Phascolosoma</i> vulgare Blainville	Muscle	****	16,12	1,18	28,10	—

- *) Corps isolé et caractérisé au laboratoire (74).
**) Dérivé isolé au cours de ce travail dans le tractus d'Arénicole, décrit dans le texte.
***) Pourcentage relatif à l'ensemble « P₃ »-urée, non séparé dans l'essai rapporté.
****) Radioactivité faible, non mesurable.

Protocole expérimental. - Comptage par scintillation liquide des chromatogrammes analytiques des extraits purifiés et planimétrie des diagrammes de comptage.

Taurocyamine (ty): chromatogrammes dans le mélange pyridine-isoamylol-acide acétique-eau (80 : 40 : 10 : 40) du filtrat de la permutite 50 (H⁺) passé sur amberlite IR 45 (OH⁻). Voir tableaux IV et V. Valeurs exprimées en % de la radioactivité totale renfermée dans la fraction étudiée.

Hypotaurocyamine (hpty), P₃, urée et corps A: (voir tableaux IV et V) éluat ammoniacal de la permutite 50 (H⁺) passé sur amberlite IRC 50, chromatographié d'abord en pyridine-isoamylol-acide acétique-eau, puis, après élution du chromatogramme préparatif, rechromatographié en phénol saturé d'eau. Valeurs exprimées en % de la radioactivité totale renfermée dans l'effluent de l'amberlite IRC 50.

TABLEAU IX - *Radioactivité spécifique de l'[amidino-¹⁴C] taurocyamine et de l'[amidino-¹⁴C] hypotaurocyamine isolées des tissus d'arénicoles et de phascolosomes, après administration de DL-[amidino-¹⁴C] arginine.*

Espèces	Tissus	ty *	hpty *	d.p.m. _{hpty}
		d.p.m./μM	d.p.m./μM	d.p.m. _{ty}
<i>Arenicola marina</i> L.	Muscle	595,5	2938,5	4,93
	Tractus	478,7	8868,2	18,52
	Muscle	218,5	629,7	2,88
<i>Phascolosoma</i> vulgare Blainville	Tractus	6750,4	20052,0	2,97

* Valeurs exprimées en désintégrations par minute (d.p.m.) par μM de produit. La radioactivité administrée aux animaux est de 14,71 × 10⁷ d.p.m. (32,52 × 10⁵ d.p.m./μM DL-[amidino-¹⁴C] arginine).

Protocole expérimental. - Voir les tableaux IV, V et VIII. Dérivés guanidiques isolés par chromatographie sur papier des extraits. Taurocyamine (ty): filtrat de la permutite 50 (H⁺) passé sur amberlite IR 45 (OH⁻) puis chromatographié en pyridine-isoamylol-acide acétique-eau (80 : 40 : 10 : 40). Hypotaurocyamine (hpty): éluat ammoniacal de la permutite 50 (H⁺), passé sur amberlite IRC 50 (H⁺), chromatographié d'abord (préparatif) en pyridine-isoamylol-acide acétique-eau, élué et rechromatographié en phénol saturé d'eau.

Activité spécifique déterminée par dosages spectrophotométriques des dérivés guanidiques avec le réactif à l' α naphthol-diacétyl (79) et mesures parallèles de la radioactivité sur quatre échantillons du produit marqué par comptage en scintillation liquide. Le bruit de fond est mesuré par plusieurs comptages d'un échantillon ayant la même composition en mélange scintillant-eau-éthanol que les essais et exprimé par la moyenne de ces comptages.

Dans le cas des dérivés que renferme la fraction ammoniacale de la permutite (effluent de l'amberlite IRC 50), les valeurs sont rapportées à la radioactivité totale de cette fraction déterminée sur les chromatogrammes analytiques équivalents aux chromatogrammes préparatifs, par comptage des différents pics et calculées en % de la radioactivité totale de cette fraction.

c) Détermination de la radioactivité spécifique de l' [*amidino*- ^{14}C] taurocyamine et de l' [*amidino*- ^{14}C] hypotaurocyamine: les résultats obtenus sont rapportés au tableau IX.

IV. DISCUSSION DES RESULTATS.

1° L'administration de l' [*amidino*- ^{14}C] arginine aux arénicoles et aux phascolosomes permet de mettre en évidence la présence dans les tissus de ces animaux d'hypotaurocyamine et de taurocyamine marquées à ^{14}C . Ces dernières se forment donc par transamidination à partir de l'arginine.

2° L'absence ou la présence seulement à l'état de traces de l'arginine dans les muscles d'arénicoles et de phascolosomes (69,78) implique que la biogénèse des deux dérivés guanidiques étudiés se produit seulement dans le tractus. Ceci est confirmé par le fait que l'activité spécifique de l'hypotaurocyamine est bien plus forte dans le tractus que dans le muscle (8868 d.p.m./ μM contre 2938 dans l'Arénicole et 20.052 d.p.m./ μM contre 629 chez le Phascolosome). Cette différence d'activité spécifique de l'hypotaurocyamine dans le tractus et dans le muscle révèle d'autres faits. Bien que la teneur en hypotaurocyamine du muscle d'Arénicole soit normalement très faible (78 et tableau VII), la baisse de $\frac{1}{3}$ de l'activité spécifique de ce corps en passant du tractus dans le muscle implique une dilution importante de l'hypotaurocyamine nouvellement formée dans ce tissu ou, ce qui revient au même, un transfert relativement lent du tractus au muscle. Le transfert de l'hypotaurocyamine est également lent chez le Phascolosome, où l'importante baisse d'activité observée résulte d'un grand effet de dilution, en raison de la richesse du muscle de Phascolosome en hypotaurocyamine. Celle-ci est bien le produit final qui s'accumule dans le muscle de Phascolosome et non dans celui d'Arénicole.

3° Chez l'Arénicole l'activité spécifique de la taurocyamine est bien plus faible que celle de l'hypotaurocyamine, du fait de l'abondance de taurocy-

mine préexistante et d'un effet de dilution plus important. La taurocyamine est bien le produit final qui s'accumule chez l'Arénicole.

Il est à remarquer que l'activité spécifique de la taurocyamine dans le tractus d'Arénicole (478,7) est inférieure de 20% à celle de ce produit dans le muscle des mêmes animaux (595,5), bien que la taurocyamine soit beaucoup plus abondante dans ce dernier tissu et que l'effet de dilution y soit plus prononcé. Ce fait signifie que la taurocyamine ne peut se former que par oxydation du dérivé sulfinique correspondant. Si elle se formait directement et parallèlement à l'hypotaurocyamine, par exemple par transamidation de la taurine en même temps que l'hypotaaurine, l'activité spécifique des deux dérivés devrait être voisine, au moins dans le tractus. La biogenèse devant nécessairement prendre naissance dans ce dernier tissu où l'arginine est présente, l'activité spécifique plus faible dans le tractus que dans le muscle implique que la taurocyamine ne s'y forme pas directement.

Les faits qui viennent d'être discutés indiquent également que l'oxydation de l'hypotaurocyamine en taurocyamine est un processus lent, qui ne semble pas être de nature enzymatique. Il est remarquable que cette oxydation spontanée soit freinée chez le Phascolosome, ce qui permet l'accumulation du dérivé sulfinique et son utilisation comme accepteur de phosphate.

RESUME ET CONCLUSIONS

1. L'administration d'[amidino-¹⁴C]arginine à des arénicoles et à des phascolosomes permet d'isoler l'hypotaurocyamine et la taurocyamine marquées à partir de tractus et de muscle de ces animaux. Ces corps se forment donc par transamidation à partir de l'arginine.

2. La comparaison de l'activité spécifique de l'hypotaurocyamine et de la taurocyamine démontre que la seconde se forme par oxydation lente de la première. La lenteur de la réaction semble relever d'un mécanisme chimique et non enzymatique. Plus prononcée chez le Phascolosome, cette transformation permet l'accumulation de l'hypotaurocyamine dans le muscle de ce dernier, où cette guanidine joue le rôle d'accepteur de phosphate.

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DE LA TRANSAMIDINASE DE PHASCOLOSOME BIOSYNTHESE DE L'HYPOTAUROCYAMINE IN VITRO

I. INTRODUCTION. OBJET DES RECHERCHES.

Les essais *in vivo* effectués sur l'Arénicole et le Phascolosome, rapportés dans la troisième partie de cette étude, ayant démontré que l'hypotaurocyamine prend naissance par transamidination à partir de l'arginine, il nous a paru intéressant d'essayer d'étudier cette réaction *in vitro*, dans le but de préciser la nature de l'accepteur du groupement amidine.

L'hypotaurocyamine étant le précurseur de la taurocyamine et celle-ci dérivant de la première par un simple processus d'oxydation, on peut supposer que l'accepteur du groupement amidine est représenté par l'hypotaaurine, présente en proportion remarquablement élevée chez l'Arénicole et le Phascolosome.

En raison de la richesse particulière de ce dernier en hypotaurocyamine et à partir des résultats de nos essais *in vivo* montrant que le lieu de synthèse de ce dérivé est le tractus, nous nous sommes proposés de purifier la transamidinase de ce tissu et d'essayer son activité sur la guanidylation de l'hypotaaurine en particulier.

L'enzyme est purifié par fractionnement au sulfate d'ammonium de l'extrait de tractus par la méthode de RATNER et ROCHOVANSKI modifiée. L'activité des préparations enzymatiques obtenues est étudiée en les incubant en présence d'arginine et de l'un des produits aminés soufrés pouvant fonctionner comme accepteur de groupement amidine. Le dosage spectrophotométrique des guanidiques synthétisés, après l'élimination de l'arginine par passage du mélange réactionnel sur résine échangeuse d'ions, est effectué avec le réactif au diacétyl- α -naphtol (79). En incubant la préparation enzymatique la plus active en présence d'[amidino- ^{14}C] arginine, nous avons isolé l'hypotaurocyamine marquée et en avons déterminé l'activité spécifique.

II. PARTIE EXPERIMENTALE.

1° *Purification de l'enzyme.* a) Extraction: les animaux (*Phascolosoma vulgare* Blainville) sont ouverts vivants et les tractus, digestif et génital, séparés des muscles, sont broyés au waring blendor et extraits avec 1,5 volumes de KCl 0,01 M glacé, contenant du glutathion 0,001 M, pendant 30 min. à 0° sous agitation mécanique lente. Après centrifugation à $6000 \times g$ pendant 15 min. à 0°, le liquide surnageant est recueilli et le résidu réextrait avec un volume de la même solution de KCl pendant 30 min. à 0°.

b) Fractionnement au sulfate d'ammonium: Les extraits réunis sont précipités par du sulfate d'ammonium entre 25 et 50% de saturation en sel. L'addition de ce dernier se fait par petites portions avec agitation mécanique à 0° pendant une heure. Le pH est maintenu constamment entre 6,5 et 7,0 à l'aide de NH_4OH ; après l'addition de sel l'agitation est poursuivie encore une heure. Le produit de précipitation entre 25 et 50% de saturation en sel, recueilli par centrifugation à $6000 \times g$ pendant 15 min. à 0°, est dissous dans une solution de glutathion 0,001 M (volume d'environ la moitié du poids initial) et la solution est clarifiée par centrifugation à $7800 \times g$ pendant 15 min. à +2°. Celle-ci est ensuite fractionnée entre 25-45 et 45-50% de saturation en sel par addition goutte à goutte de solution froide saturée de sulfate d'ammonium à 0° pH 7,5 et sous agitation mécanique. Les précipités obtenus sont gardés en suspension dans une solution de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 70% de la saturation jusqu'au moment de l'emploi.

2° *Essais d'activité.* L'activité des différentes fractions est essayée par incubation de l'enzyme en présence d'arginine et de taurine ou hypotaurine et dosage spectrophotométrique des dérivés formés après fixation de l'arginine restante sur résine échangeuse d'ions. L'enzyme, préalablement séparé de la suspension dans la solution de sulfate d'ammonium par centrifugation à $20000 \times g$ pendant 10 min. à 0°, est dissous dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7,2. Il est utilisé comme tel ou après dialyse. Au cours de l'incubation les groupes SH de l'enzyme sont protégés par addition de glutathion 0,01 M.

Chaque série d'expériences se compose de quatre essais: essais avec l'un ou l'autre des produits aminés soufrés, l'essai avec l'arginine sans dérivé soufré et le témoin composé uniquement d'enzyme et de tampon. Les quantités de réactifs utilisés sont en général les suivantes: DL-arginine (chlorhydrate): 15 μmoles , taurine ou hypotaurine: 25 μmoles , phosphate K, pH 7,2: 50 μmoles , glutathion: 1,5 μmoles . Volumes totaux: 1,5 ml. Temps d'incubation: 2h. sauf indications contraires, à 30°.

Les incubations sont arrêtées par addition de ml. 0,15 d'acide acétique M et défécation au bain-marie bouillant pendant 10 min. Les incubats

neutralisés à pH 7,0 par addition de phosphate de K 0,5 M, pH 7,0, sont passés quantitativement sur amberlite IR 120 (Na⁺), tamponnée à pH 7,0 à l'aide de tampon phosphate de K 0,5 M (volume de résine par essai : ml. 2,5). La résine est lavée avec du tampon phosphate 0,01 M jusqu'à ce que le volume total soit de 20 ml. Sur une partie aliquote des effluents les dérivés guanidiques sont dosés spectrophotométriquement avec le réactif à l' α -naphthol-diacétyle selon la technique de ROSENBERG et coll. (79).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus en incubant les extraits fractionnés de tractus de Phascolosome avec l'arginine, en présence ou en l'absence de taurine et d'hypotaaurine et rapportés au tableaux X mettent en évidence les faits suivants :

1° Il y a augmentation des dérivés guanidiques totaux, non compris l'arginine, lorsque l'enzyme est incubé en présence de cet acide aminé. Il y a transamidination à partir de l'arginine (préparation n° 1; essais 1, 2 et 3).

2° Cette augmentation se manifeste indépendamment de l'addition de taurine ou d'hypotaaurine. Tout se passe comme si l'extrait enzymatique est déjà saturé en accepteur de groupe amidine. La dialyse, qui semble inactiver l'enzyme, est insuffisante pour éliminer les substrats naturels renfermés dans les extraits.

TABLEAU X - Biosynthèse de dérivés guanidiques par des préparations de transamidinase de phascolosomes

N°	Préparation enzymatique		Dialyse	Densité optique lue au spectrophotomètre			
	% saturation en SO ₄ (NH ₄) ₂			Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4
	1er fractionnement	2ème fractionnement					
1	25 - 50	25 - 45	+	0,180	0,194	0,178	0,195
		45 - 50	+	0,270	0,268	0,269	0,228
		25 - 45	—	0,420	0,362	0,465	0,196
		45 - 50	—	0,346	0,410	0,468	0,298
		45 - 50	—	0,545	0,605	0,630	0,425
		40 - 50	—	0,610	0,527	0,401	0,231
2	25 - 50	40 - 50 *	—	0,399	0,355	0,362	0,042

* Dans cette série d'essais, la résine utilisée est l'amberlite IRC 50 (H⁺), qui fixe tous les dérivés guanidiques présents, sauf l'hypotaurocyamine et la taurocyamine; pour cette raison, les valeurs de base (essai 4) sont plus faibles que dans les autres séries.

Protocole expérimental. - Extraits de tractus de Phascolosome, fractionnés au sulfate d'ammonium cristallisé (1er fractionnement), puis avec une solution saturée du même sel (2ème fractionnement). Les extraits sont incubés 2 h à 30° en présence de : taurine

25 μ moles, arginine 15 μ moles (essai 1), hypotaurine 25 μ moles, arginine 15 μ moles (essai 2), arginine 15 μ moles (essai 3) et de phosphate de K, pH 7,2 50 μ moles, glutathion 1,5 μ mole. L'essai 4 renferme tous les réactifs sauf l'arginine et les dérivés aminés. Vol.: 1,5 ml. Incubations arrêtées par addition d'acide acétique M (0,15 ml). Après défécation au bain-marie bouillant, les mélanges réactionnels sont neutralisés à pH 7,0 et passés sur amberlite IR 120 (Na⁺), tamponée à pH 7,0 (vol. de résine par essai: 2,5 ml). Dosage des dérivés guanidiques au moyen du réactif au diacétyle- α -naphтол (79).

Les résultats obtenus en incubant l'une des préparations enzymatiques avec l' [*amidino*-¹⁴C] arginine, en la présence ou en l'absence de taurine et d'hypotaurine, rapportés dans le tableau XI, montrent que l'hypotaurocyamine isolée par passage sur résines échangeuses d'ions et par chromatographie sur papier est marquée. La radioactivité spécifique mesurée est de 34,62 à 42,84 $\times 10^5$ d.p.m./ μ M, chiffre pratiquement supersposable, aux erreurs expérimentales près, à la radioactivité de l'arginine mise en oeuvre : 35,52 $\times 10^5$ d.p.m./ μ M. Ce résultat signifie que la radioactivité du groupe amidinique de l'arginine mise en présence avec l'extrait enzymatique se retrouve sans dilution dans l'hypotaurocyamine isolée.

TABLEAU XI - Synthèse in vitro d' [*amidino*-¹⁴C] hypotaurocyamine par un extrait purifié de tractus de phascolosome en présence de DL- [*amidino*-¹⁴C] arginine

DL- [<i>amidino</i> - ¹⁴ C] arginine incubée	Radioactivité spécifique (en d.p.m. $\times 10^5/\mu$ M)		
	[<i>amidino</i> - ¹⁴ C] hypotaurocyamine isolée par chromatographie sur papier		
	essai 1	essai 2	essai 3
35,52	34,62	42,84	39,57

Protocole expérimental. - Préparation n° 2, 2ème fractionnement (voir tableau X), incubée 2 h à 30° en présence de DL- [*amidino*-¹⁴C] arginine (activité spécifique: 2,2 mC/mM) 15 μ moles et de taurine 25 μ moles (essai 1) ou d'hypotaurine 25 μ moles (essai 2) ou sans dérivés aminés (essai 3), avec tampon phosphate K, pH 7,2 50 μ moles et glutathion 1,5 μ moles. Vol.: 1,5 ml. Incubations arrêtées par addition de 0,15 ml d'acide acétique M et défécation au bain-marie bouillant. Les mélanges réactionnels, neutralisés par l'ammoniaque, sont passés à + 4° sur amberlite IR 120 (Na⁺), tamponée à pH 7,0. Les résines sont lavées abondamment à l'eau distillée bouillie et les effluents réunis sont lyophilisés. Le liquide concentré est chromatographié sur papier (voir p. 38). Dosage spectrophotométrique des dérivés guanidiques au réactif diacétyle- α -naphтол (79), e comptage parallèle par scintillation liquide des éluats des chromatogrammes préparatifs (voir p. 38).

Deux autres faits doivent être soulignés. 1° La taurocyamine n'est repérable ni chimiquement ni par comptage en scintillation liquide. Aucun autre produit radioactif que l'hypotaurocyamine n'a pu être mis en évidence.

2° L'activité spécifique de l'hypotaurocyamine isolée est indépendante de l'addition de taurine ou d'hypotaurine. L'absence d'intermédiaire radioactif entre l'arginine marquée et l'hypotaurocyamine également marquée autorise à penser que l'accepteur du groupe ¹⁴C- amidine est constitué par l'hypotaurine présente dans l'extrait enzymatique, et, éventuellement, saturant l'enzyme.

RESUME ET CONCLUSIONS

1. L'incubation des extraits purifiés de tractus de Phascolosome, *Phascolosoma vulgare* Blainville, permet de mettre en évidence la présence d'une transamidation assurant la formation des dérivés guanidiques.

2. En présence d'[amidino-¹⁴C]arginine, l'extrait purifié de tractus de Phascolosome permet de mettre en évidence la formation d'hypotaurocyamine de même activité spécifique que l'arginine initiale. Ni la présence de taurocyamine radioactive ni celle d'intermédiaire marqué n'ont été observées.

L'ensemble des résultats obtenus démontre la formation d'hypotaurocyamine par transamidation directe à partir de l'arginine.

3. En définitive, la biogenèse des guanidines soufrées suit la voie générale de transamidation bien établie chez les Vertébrés (16, 17, 108, 110) et étudiée récemment chez les Invertébrés à propos de la formation de la lombricine (80), de l'hirudonine (71) et de l'arcaïne (73).

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

I. ORIGINE DU GROUPE AMIDINE DE LA TAUROCYAMINE ET DE L'HYPOTAUROCYAMINE

1° *L'hypotaurocyamine, précurseur de la taurocyamine.* Les essais réalisés *in vivo* à l'aide d'[amidino-¹⁴C] arginine ont montré que, chez l'Arénicole (*Arenicola marina* L.) et le Phascolosome (*Phascolosoma vulgare* Blainville), organismes renfermant dans leurs tissus les deux dérivés guanidiques soufrés, la taurocyamine provient de l'hypotaurocyamine par oxydation du groupe sulfonique en dérivé sulfonique. Cette oxydation, que sa lenteur assimile à une réaction spontanée, se produit sans formation d'intermédiaires décelables. Les propriétés chimiques de l'hypotaurocyamine, étudiées par ailleurs, en particulier sa labilité et la facilité relative de sa transformation en taurocyamine par l'action d'agents faiblement oxydants, laissent prévoir ce mode de formation de l'amidinotaurine.

En dehors des deux organismes étudiés, on peut se demander si la biogénèse de la taurocyamine emprunte toujours cette voie, même chez les espèces où la taurocyamine n'est apparemment pas accompagnée par l'hypotaurocyamine. On peut admettre que, chez ces animaux, l'hypotaurocyamine a échappé jusqu'à présent à l'analyse des extraits, soit à cause de son oxydation accidentelle par manque de précaution au cours des manipulations, soit à cause de sa présence en quantités extrêmement faibles, non décelables par les techniques employées. A cet égard il faut remarquer que la présence d'hypotaurocyamine chez l'Arénicole, où le rapport taurocyamine/hypotaurocyamine est de 10, n'a été signalée qu'après la découverte de l'hypotaurocyamine chez le Phascolosome (78). Il est donc vraisemblable que, chez les animaux dont la teneur en taurocyamine est faible (70, 96, 97, 75, 84, 13) ou dont l'étude a été faite antérieurement à la découverte de l'hypotaurocyamine, les deux guanidines soufrées coexistent, l'une étant le précurseurs de l'autre.

Il faut noter en outre que l'oxydation de l'hypotaurocyamine en taurocyamine est beaucoup plus lente chez le Phascolosome que chez l'Arénicole, ce qui permet l'accumulation de la première et son utilisation comme accepteur de phosphates chez le Sipunculien. Si le processus d'oxydation est

purement chimique, le ralentissement observé suppose soit l'existence d'un milieu réducteur capable de freiner la transformation du dérivé sulfinique, soit un manque d'agents oxydants indispensables à la formation du dérivé sulfonique.

2° *Formation de l'hypotaurocyamine.* Les expériences *in vitro* réalisées avec les extraits purifiés de tractus de phascolosomes, en présence d'[amidino-¹⁴C]arginine démontrent la formation d'hypotaurocyamine radioactive par transamidination à partir de l'arginine. Dans les mêmes conditions, la formation de taurocyamine marquée n'a pas été observée. Il n'a pas été possible toutefois de démontrer que l'addition d'hypotaurine augmente la formation du dérivé guanidique correspondant, sans doute parce que l'enzyme est saturé de substrat préexistant. Seule l'absence constatée de tout intermédiaire radioactif entre l'arginine-amidino-¹⁴C introduite et l'hypotaurocyamine marquée de même activité spécifique que le donateur d'amidine, permet de conclure que l'hypotaurine est le précurseurs immédiat du dérivé guanidique correspondant. Il est à noter que, si la transamidinase de Phascolosome possède les mêmes propriétés que celle des Vertébrés intervenant dans la synthèse de la créatine (reins de porc), la difficulté à éliminer le substrat de son enzyme s'explique facilement. L'enzyme des Vertébrés est, en effet, de caractère très acide et se fixe fortement sur la DEAE-cellulose et la guanidine-cellulose; il ne peut s'éluer qu'en milieu relativement acide (87,91). Cette propriété permet à l'enzyme de fixer fortement les dérivés aminés qui servent de substrats.

II. LES PRECURSEURS SOUFRES DE LA TAUCYAMINE ET DE L'HYPOTAUCYAMINE.

Les expériences entreprises *in vivo* tant sur les arénicoles que sur les rats, au moyen de molécules marquées à ³⁵S (cystine, sulfite, sulfate) ont permis de mettre en évidence dans certains essais la formation de taurine, d'hypotaurine et de taurocyamine marquées. La faible activité spécifique mesurée des produits isolés et l'inconstance des résultats obtenus - soulignée par exemple par la formation parallèle d'hypotaurine et de taurocyamine marquées après administration de sulfite et l'absence de guanidines soufrées marquées dans certains essais à [³⁵S] cystine - laissent supposer que des échanges actifs des groupes soufrés SH, SO₂, SO₃⁻, bien connus par ailleurs (39,34,35), se produisent chez les Invertébrés comme chez les Vertébrés. Ces réactions d'échange peuvent expliquer également l'incohérence des résultats obtenus par ABBOTT et AWAPARA (1) et montrent qu'il est très difficile d'étudier la biogenèse des guanidines soufrées au moyen des molécules marquées à ³⁵S.

III. LIEU DE SYNTHÈSE DE LA TAUROCYAMINE ET DE L'HYPOTAUROCYAMINE.

L'étude de la radioactivité spécifique de l' [*amidino* - ^{14}C] hypotaurocyamine et de l' [*amidino* - ^{14}C] taurocyamine isolées des muscles et des tractus d'arénicoles et de phascolosomes ayant reçu de l' [*amidino* - ^{14}C] arginine permet d'établir le schéma suivant.

1. Chez l'Arénicole, l'hypotaurocyamine prend naissance dans le tractus digestif et génital, où sa concentration est par ailleurs assez faible et d'où elle diffuse dans le muscle, dont la concentration en ce dérivé est plus importante. Ici survient le processus d'oxydation aboutissant à la transformation en taurocyamine, constituant guanidique essentiel de cette espèce et jouant le rôle d'accepteur de phosphate. La présence d'hypotaurocyaminephosphate à côté de phosphotaurocyamine dans le muscle de l'Arénicole, récemment signalée (78), ne permet pas cependant conclure que la première puisse servir de phosphagène au même titre que la seconde. Sa faible concentration dans les tissus d'arénicoles, l'étroite spécificité de la taurocyaminephosphokinase (64, 65), limitent vraisemblablement le rôle du dérivé sulfinique au regard de celui de l'amidinotaurine.

2. Chez le Phascolosome, l'hypotaurocyamine se forme également dans le tractus, d'où elle diffuse dans le muscle et y joue le rôle d'accepteur de phosphate. La valeur importante du rapport entre les activités spécifiques de ce dérivé dans le tractus et le muscle (31,84) est expliquée par l'effet de dilution, l'hypotaurocyamine étant le constituant guanidique principal du muscle. Quant à la taurocyamine, dont la signification biologique chez cet organisme doit être réduite en raison de sa faible teneur chez les phascolosomes et l'étroite spécificité de l'hypotaurocyaminephosphokinase (101), elle prend naissance également dans les deux tissus par oxydation lente du dérivé sulfinique.

R E S U M E

1. La biogenèse de l'hypotaurocyamine (acide 2.guanidoéthanesulfinique) et de la taurocyamine (acide 2.guanidoéthanesulfonique) a été étudiée chez des Vertébrés (rats) et des Invertébrés (arénicoles, phascolosomes), où la présence de ces guanidines avait été précédemment caractérisée.

2. L'étude des précurseurs soufrés de la taurocyamine a été effectuée *in vivo*, chez le Rat et l'Arénicole, par administration de molécules marquées au ^{35}S (DL- [^{35}S] cystine, [^{35}S] SO_3Na_2 , [^{35}S] SO_3Na_2). L'étude radiochromatographique des urines (rats) ou des tissus (arénicoles) a permis de mettre en évidence, dans certains essais, la formation de taurine, d'hypotaurine et de taurocyamine marquées. Mais la faible activité spécifique des produits isolés et l'inconstance des résultats obtenus, dues vraisemblablement à des échanges actifs des groupes soufrés $-\text{SH}$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3^-$, bien connus par ailleurs, montrent qu'il est très difficile d'étudier la biogenèse des guanidines soufrées au moyen des molécules marquées à ^{35}S .

3. L'origine du groupement amidine de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine a été établie *in vivo* par administration de DL- [$\text{amidino}-^{14}\text{C}$] arginine, parallèlement à des arénicoles dont les tissus sont riches en taurocyamine et pauvres en hypotaurocyamine, et à des phascolosomes, qui renferment au contraire beaucoup plus d'hypotaurocyamine que du dérivé sulfonique. La formation dans les tissus de ces animaux d' [$\text{amidino}-^{14}\text{C}$] amidinotaurine et d' [$\text{amidino}-^{14}\text{C}$] amidinohypotaurine, mise en évidence par analyse radiochromatographique, montre que le groupe amidinique de ces dernières provient de l'arginine.

4. Aussi bien chez l'Arénicole que chez le Phascolosome et dans le muscle que dans le tractus, la radioactivité spécifique de l'hypotaurocyamine formée *in vivo* à partir de l' [$\text{amidino}-^{14}\text{C}$] arginine est supérieure à celle de la taurocyamine marquée formée dans la même expérience (de 3 à 18 fois suivant les tissus). L'hypotaurocyamine est donc le précurseur naturel de la taurocyamine, qui provient de l'oxydation du groupement sulfinique en son dérivé sulfonique; cette oxydation, beaucoup plus lente chez le Phascolosome, où l'hypotaurocyamine s'accumule dans le muscle sous forme libre ou phosphorylée, que chez l'Arénicole, où la taurocyamine et la phosphotaurocyamine constituent la plus grande partie des dérivés guanidiques des tissus, se produit sans formation d'intermédiaires décelables.

5. L'étude de la radioactivité spécifique de l' [$\text{amidino}-^{14}\text{C}$] hypotaurocyamine et de l' [$\text{amidino}-^{14}\text{C}$] taurocyamine isolées des muscles et des tractus de phascolosomes et d'arénicoles ayant reçu de l' [$\text{amidino}-^{14}\text{C}$] arginine renseigne sur le lieu de synthèse des deux guanidines soufrées. L'hypotauro-

cyamine se forme dans le tractus où son activité spécifique est très supérieure à celle observée dans le muscle (environ 3 fois chez l'Arénicole et 30 fois chez le Phascolosome, où l'effet de dilution dans le muscle est plus important); ce fait est confirmé par la localisation presque exclusive dans ce tissu de l'arginine nécessaire à la transamidination. L'oxydation du dérivé sulfinique en taurocyamine, dont la nature n'est pas encore précisée, se produirait, au moins pour l'Arénicole, de préférence dans le muscle, après diffusion de l'hypotaurocyamine dans ce tissu.

6. La transamidinase du Phascolosome a été étudiée *in vitro*, après purification partielle par fractionnement au sulfate d'ammonium. L'incubation de l'enzyme en présence de DL-[amidino-¹⁴C] arginine a permis d'isoler des essais de l'hypotaurocyamine marquée au ¹⁴C, ayant sensiblement la même activité spécifique que l'arginine initiale, alors qu'aucune formation de taurocyamine n'a été observée. Ce fait confirme que seule l'hypotaurocyamine se forme par transamidination à partir de l'arginine en présence de l'enzyme de Phascolosome.

7. En conclusion, la biogenèse du groupement amidinique de l'hypotaurocyamine suit la voie précédemment établie chez les Vertébrés et récemment vérifiée chez des Invertébrés pour la biosynthèse de la lombricine, de l'hirudonine et de l'arcaïne.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ABBOTT, W. et AWAPARA, J., *Biol. Bull.*, **119**, n. 3, 357 (1960).
- 2 - ACKERMANN, D., *Z. physiol. Chem.*, **232**, 206 (1935).
- 3 - ACKERMANN, D., *Z. physiol. Chem.*, **234**, 209 (1935).
- 4 - ACKERMANN, D. et HEINSEN, H.A., *Z. physiol. Chem.*, **235**, 115 (1935).
- 5 - ACKERMANN, D., *Z. physiol. Chem.*, **302**, 80 (1955).
- 6 - AWAPARA, J., *J. Biol. Chem.*, **203**, 183 (1953).
- 7 - BARRENSCHEEN, H.K. et WELTMANN, O., *Biochem. Z.*, **131**, 591 (1922).
- 8 - BATERMAN, J.C., CARLTON, H.N., CALVERT, R.C. et LINDEBLAD, G.E., *Int. J. App. Radiation and Isotopes*, **7**, 287 (1960).
- 9 - BEATTY, J.M. et MAGRATH, D.I., *Nature*, **183**, 591 (1959).
- 10 - BERGERET, B., CHATAGNER, F. et FROMAGEOT, Cl., *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 147 (1952).
- 11 - BERGERET, B. et CHATAGNER, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 543 (1954).
- 12 - BERGMANN, M. et ZERVAS, L., *Z. physiol. Chem.*, **172**, 277 (1927).
- 13 - BLASS, J.D., *Biochem. J.*, **77**, 484 (1960).
- 14 - BLOCH, K. et SCHOENHEIMER, R., *J. Biol. Chem.*, **134**, 785 (1940).
- 15 - BLOCH, K. et SCHOENHEIMER, R., *J. Biol. Chem.*, **138**, 167 (1941).
- 16 - BORSOOK, H. et DUBNOFF, J.W., *Science*, **91**, 551 (1940).
- 17 - BORSOOK, H. et DUBNOFF, J.W., *J. Biol. Chem.*, **138**, 389, (1941).
- 18 - BRAND, E. et BRAND, F.C., *Org. Syntheses, Coll. Vol.* **3**, 440 (1947).
- 19 - BRICAS, E., KIEFFER, F. et FROMAGEOT, Cl., *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 358 (1955).
- 20 - CAVALLINI, D. et MONDOVÌ, B., *Giorn. Biochim.*, **1**, 170 (1951).
- 21 - CAVALLINI, D., DE MARCO, C. et MONDOVÌ, B., *Ricerca Sci.*, **24**, 1021 (1954).
- 22 - CAVALLINI, D., MONDOVÌ, B. et DE MARCO, C., *Ricerca Sci.*, **24**, 2649 (1954).
- 23 - CAVALLINI, D., DE MARCO, C., MONDOVÌ, B. et STIRPE, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 301 (1954).
- 24 - CAVALLINI, D., MONDOVÌ, B. et DE MARCO, C., *J. Biol. Chem.*, **216**, 277 (1955).
- 25 - CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 415 (1954).
- 26 - CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P., *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 275 (1955).
- 27 - CHAPEVILLE, F., FROMAGEOT, P., BRIGELHUBER, A. et HENRY, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 351 (1956).
- 28 - CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P., *Coll. Intern. Biochimie Soufre, C.N.R.S.*, Paris, 1956, p. 107.
- 29 - CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P., *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 538 (1957).
- 30 - CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P., *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 328 (1961).
- 31 - CHATAGNER, F. et BERGERET, B., *Compt. rend.*, **232**, 448 (1951).
- 32 - CHATAGNER, F., BERGERET, B., SEJOURNÉ, T. et FROMAGEOT, Cl., *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 340 (1952).
- 33 - DAVIDSON, J.D. et FEIGELSON, P., *Int. App. Radiation and Isotopes*, **2**, 1 (1957).
- 34 - DE MARCO, C. et COLETTA, M., *Experientia*, **16**, 534 (1960).
- 35 - DE MARCO, C. et TENTORI, L., *Experientia*, **17**, 345 (1961).
- 36 - DITTRICH, E., *J. prakt. Chem.*, **18**, 63 (1878).
- 37 - DZIEWIATKOWSKI, D.D., *J. Biol. Chem.*, **207**, 181 (1954).
- 38 - ELDERFIELD, R.C. et GREEN, M., *J. Org. Chem.*, **17**, 442 (1952).
- 39 - ELDJARN, L. et NYGAARD, O., *Arch. Intern. Physiol.*, **62**, 476 (1954).
- 40 - ELDJARN, L., PIHL, A. et SVERDRUP, A., *J. Biol. Chem.*, **223**, 353 (1956).
- 41 - ELDJARN, L. et PIHL, A., *J. Biol. Chem.*, **225**, 499 (1957).
- 42 - ENGEL, R., *Ber. deut. chem. Ges.*, **8**, 1957 (1875).
- 43 - ENGELAND, R. et KUTSCHER, F., *Ber. deut. chem. Ges.*, **43**, 2882 (1910).
- 44 - ERLÉNMYER, E., *Ber. deut. chem. Ges.*, **3**, 896 (1870).
- 45 - FISKE, C.H. et SUBBAROW, Y., *J. Biol. Chem.*, **81**, 629 (1929).

- 46 - FROMAGEOT, Cl., *The Harvey Lectures*, **49**, 1 (1953).
- 47 - FROMAGEOT, P., CHAPEVILLE, F. et PETIT, L., *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 12 (1957).
- 48 - GREEN, M., *Dissertation abstracts*, **14**, 18 (1954).
- 49 - HAYES, F. N. et GOULD, R. G., *Science*, **117**, 480 (1953).
- 50 - HAYES, F. N., *Int. J. App. Radiation and Isotopes*, **1**, 46 (1956).
- 51 - HOBSON, G. E. et REES, K. R., *Biochem. J.*, **61**, 549 (1955).
- 52 - KALCKAR, H. M., *Chem. Rev.*, **28**, 71 (1941).
- 53 - KAPFHAMMER, J. et MÜLLER, H., *Z. physiol. Chem.*, **225**, 1 (1934).
- 54 - KEARNEY, E. B. et SINGER, T. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 270 (1953).
- 55 - KEARNEY, E. B. et SINGER, T. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 276 (1953).
- 56 - KURTZ, A. C., *J. Biol. Chem.*, **180**, 1253 (1949).
- 57 - KUTSCHER, F. et ACKERMANN, D., *Ann. Rev. Biochem.*, **5**, 453 (1936).
- 58 - MACHLIN, L. J., PEARSON, P. B. et DENTON, C. A., *J. Biol. Chem.*, **212**, 469 (1955).
- 59 - MEYERHOF, O. et LOHMANN, K., *Biochem. Z.*, **196**, 22 (1928).
- 60 - MORGUE, M., *Bull. soc. chim. France*, **15**, 181 (1948).
- 61 - NUNEZ, J. et JACQUEMIN, Cl., *J. Chromatog.*, **5**, 271 (1961).
- 62 - OKITA, G. T., SPRATT, J. et LE ROY, G. V., *Nucleonics*, **14**, n. 3, 76 (1956).
- 63 - PISANO, J. J., MITOMA, C. et UDNENFRIEND, S., *Nature*, **180**, 1125 (1957).
- 64 - PRADEL, L. A. et THOAI, N. V., *Coll. Intern. Biochimie Acides Aminés Basiques, C.N.R.S., Paris*, 1960, p. 419.
- 65 - PRADEL, L. A., *Thèse Doct. Sci. Phys.*, Paris, 1961.
- 66 - RATNER, S. et ROCHOVANSKY, O., *Arch. Biochem. Biophys.*, **63**, 277 (1956).
- 67 - RATNER, S. et ROCHOVANSKY, O., *Arch. Biochem. Biophys.*, **63**, 296 (1956).
- 68 - RATSISALOVANNA, O., CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P., *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 322 (1961).
- 69 - ROBIN, Y., *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Paris, 1954.
- 70 - ROBIN Y. et ROCHE, J., *Compt. rend. soc. biol.*, **148**, 1783 (1954).
- 71 - ROBIN, Y., AUDIT, C., ZAPPACOSTA, S. et THOAI, N. V., *Comp. Biochem. Physiol.*, **7**, 221 (1962).
- 72 - ROBIN, Y. et THOAI, N. V., *Biochim. Biophys. Acta*, **63**, 481 (1962).
- 73 - ROBIN, Y., AUDIT, C. et THOAI, N. V., *Comp. rend. soc. biol.*, **156**, 1232 (1962).
- 74 - ROBIN, Y. et THOAI, N. V., *en préparation*.
- 75 - ROBYNS, J., *Thèse Doct. Sci.*, Bruxelles, 1957.
- 76 - ROCHE, J., THOAI, N. V. et HATT, J. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 71 (1954).
- 77 - ROCHE, J., ROBIN, Y., THOAI, N. V. et PRADEL, L. A., *Comp. Biochem. Physiol.*, **1**, 44 (1960).
- 78 - ROCHE, J., ROBIN, Y., DI JESU, F. et THOAI, N. V., *Compt. rend. soc. biol.*, **156**, 830 (1962).
- 79 - ROSENBERG, H., ENNOR, A. H. et MORRISON, J. F., *Biochem. J.*, **63**, 153 (1956).
- 80 - ROSSITER, R. J., GAFFNEY, T., ROSENBERG, H. et MORRISON, J. F., *Nature*, **185**, 383 (1960).
- 81 - SALVATORE, G., *Compt. rend. soc. biol.*, **153**, 388 (1959).
- 82 - SCHENCK, M. et KIRCHHOF, H., *Z. physiol. Chem.*, **155**, 293 (1926).
- 83 - SCHÖBERL, A., *Z. physiol. Chem.*, **216**, 193 (1933).
- 84 - SCHRAM, E. et CROCKAERT, R., *Bull. soc. chim. biol.*, **39**, 561 (1957).
- 85 - SCHULZE, E. et WINTERSTEIN, E., *Ber. deut. chem. Ges.*, **32**, 3191 (1899).
- 86 - SCHÜTTE, E., *Z. physiol. Chem.*, **279**, 52 (1943).
- 87 - SEMENZA G., *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1057 (1960).
- 88 - STEVENS, C. M. et BUSH, J. A., *J. Biol. Chem.*, **183**, 139 (1950).
- 89 - STRECKER, A., *Jahresber. d. Chemie*, 530 (1861).
- 90 - TATARINOFF, A., *Jahresber. d. Chemie* 333 (1879).
- 91 - THIEM, N. V. et LACOMBE, G., *Communication personnelle*.
- 92 - THOAI, N. V., ROCHE, J., ROBIN, Y. et THIEM, N. V., *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 593 (1953).

- 93 - THOAI, N.V., ROCHE, J., ROBIN, Y. et THIEM, N.V., *Compt. rend. soc. biol.* **147**, 1241 (1953).
- 94 - THOAI, N.V. et ROBIN, Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 533 (1954).
- 95 - THOAI, N.V. et ROBIN, Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 76 (1954).
- 96 - THOAI, N.V., ROCHE, J. et OLOMUCKI, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 448 (1954).
- 97 - THOAI, N.V., OLOMUCKI, A., ROBIN, Y., PRADEL, L.A. et ROCHE, J., *Compt. rend. soc. biol.*, **150**, 2160 (1956).
- 98 - THOAI, N.V., *Bull. soc. chim. biol.*, **39**, 197 (1957).
- 99 - THOAI, N.V. et THEIM, N.V., *Bull. soc. chim. biol.*, **39**, 355 (1957).
- 100 - THOAI, N.V., *Coll. Intern. Biochimie Acides Aminés Basiques*, C.N.R.S., Paris, 1960, p. 297.
- 101 - THOAI, N.V., ROBIN, Y. et PRADEL, L.A., *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- 102 - THOAI, N.V. et MANCHON, Ph., *travaux non publiés*.
- 103 - THOAI, N.V., OLOMUCKI, A. et ROBIN, Y., *travaux non publiés*.
- 104 - THOMAS, K. et KAPFHAMMER, J., *Sächs. Akad. d. Wissenschaft. Math. Phys. Kl.*, **77**, 181 (1925).
- 105 - TRAUBE, W. et GORNIK, K., *Z. angew. Chem.*, **42**, 379 (1929).
- 106 - VOLHARD, J., *Chem. Zentr.*, **14**, 364 (1869).
- 107 - WALKER, J.B., *J. Biol. Chem.*, **224**, 57 (1957).
- 108 - WALKER, J.B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **98**, 7 (1958).
- 109 - WALKER, J.B., *J. Biol. Chem.*, **231**, 1 (1958).
- 110 - WALKER, J.B., *J. Biol. Chem.* **235**, 2357 (1960).
- 111 - WELSCH, M., CAVALLO, G. et CANTELMO, P., *Rev. belg. Pathol. Méd. exper.*, **27**, 241 (1953).
- 112 - WILSON, J.D., GIBSON, K.D. et UDENFRIEND, S., *J. Biol. Chem.* **235**, 3539 (1960).
- 113 - ZEILE, K. et FAWAZ, G., *Z. physiol. Chem.*, **236**, 193 (1938).
- 114 - ZIEGLER, C.A., CHLECK, D.J. et BRINKERHOFF, J., *Anal. Chem.* **29**, 1774 (1957).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION. LES GUANIDINES SOUFREES BIOLOGIQUES

I. Structure chimique	pag.	17
II. Répartition	»	18
III. Méthodes de préparation	»	19
IV. Métabolisme	»	20
PLAN DES RECHERCHES	»	23

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIERE PARTIE

MATERIEL ET TECHNIQUES D'ETUDE

I. Matériel	pag.	24
II. Techniques	»	25

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES PRECURSEURS SOUFRES DE LA TAUROCYAMINE

I. Introduction. Objet des recherches	pag.	28
II. Partie expérimentale	»	29
III. Résultats	»	32
IV. Discussion des résultats	»	34
Résumé et conclusions	»	35

TROISIEME PARTIE

ETUDE DE L'ORIGINE DU GROUPEMENT AMIDINE, DU LIEU DE SYNTHÈSE ET DE L'ORDRE DE FORMATION DE LA TAUROCYAMINE ET DE L'HYPOTAUROCYAMINE

I. Introduction. Objet des recherches	pag.	36
II. Partie expérimentale	»	36
III. Résultats	»	39
IV. Discussion des résultats	»	50
Résumé et conclusions	»	51

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DE LA TRANSAMIDINASE DE PHASCOLOSOME. BIOSYNTHESE DE L'HYPOTAUROCYAMINE IN VITRO

I. Introduction. Objet des recherches	pag.	53
II. Partie expérimentale	»	54
III. Résultats et discussion	»	55
Résumé et conclusions	»	57
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	»	58
RESUME	»	61
BIBLIOGRAPHIE	»	63
TABLE DES MATIERES	»	67

Finito di stampare il 15-4-1964 nello Stabilimento
ARTI GRAFICHE DELLA TORRE - S.A.S. - PORTICI

